

Funktion und Zusammensetzung der nukleären RNase P und RNase MRP in Pflanzen

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

der Universität Leipzig

genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

..... doctor rerum naturalium.....

..... Dr. rer. nat.....

vorgelegt

von

Diplom-Biochemiker Mario Krehan

geboren am 03.11.1979 in Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Andrea Robitzki

Gutachter: Prof. Dr. Mario Mörl

Gutachter: Prof. Dr. Peter Seibel

Tag der Verteidigung: 07. September 2012

Die vorgelegte Arbeit wurde im Zeitraum vom 15.11.2004 bis zum 31.12.2011 am Institut für Biochemie der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie sowie am Institut für Molekulare Zelltherapie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig unter Anleitung von Frau PD Dr. Astrid Schön angefertigt. Die Arbeit wurde an der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie durch Prof. Dr. Mario Mörl betreut.

Bibliografische Darstellung

Mario Krehan

Funktion und Zusammensetzung der nukleären RNase P und RNase MRP in Pflanzen

Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

Universität Leipzig

Dissertation

271 Seiten, 284 Literaturangaben, 92 Abbildungen, 13 Tabellen

In allen Organismen wird die genetische Information der DNA in mRNA umgeschrieben und diese im Cytosol als Vorlage für die Proteinbiosynthese benutzt. Dabei dienen tRNAs als codonspezifische Adaptermoleküle, die als Vorläufermoleküle (pre-tRNA) transkribiert werden. Eine Reaktion bei der Reifung übernimmt die Ribonuklease P (RNase P). Sie ist eine essentielle Endonuklease, die die 5'-Flanke von pre-tRNAs entfernt. Eine weitere Endonuklease ist die RNase MRP (*Mitochondrial RNA Processing*), die mit der RNase P bis zu zehn Proteine gemeinsam hat. Ein Unterschied ist die eigene RNA-Untereinheit sowie die Funktion. RNase MRP ist bei der Reifung der mitochondrialen 5,8S rRNA beteiligt. Während die RNase P/MRP in den Eukaryoten Hefe und Mensch sehr detailliert untersucht werden, gibt es bis dato nur wenig Wissen über die RNase P/MRP in Pflanzen.

In dieser Arbeit wurden vier Proteine, die homolog zu den menschlichen RNase P/MRP Proteinen sind, identifiziert und näher charakterisiert. Zwei als RNase MRP-Typ annotierte RNAs wurden in dieser Arbeit *in vivo* nachgewiesen. Der Fokus dieser Arbeit lag dabei in der Charakterisierung der Transkriptions- und Translationsprodukte sowie deren Beziehung zu RNase P/MRP. Dabei wurden annotierte mRNAs bestätigt und neue Spleißvarianten identifiziert. Mit spezifischen Antikörpern, die die identifizierten Proteine erkennen, konnten die Proteine im *Arabidopsis thaliana* Proteinextrakt sowie im Weizenkeimproteinextrakt nachgewiesen werden. Mit AtPOP1p-spezifischen Antikörpern konnte RNase P-Aktivität aus einem Proteinextrakt isoliert werden. Darin befand sich auch eine der beiden RNase MRP RNAs, die Bestandteil der RNase P Funktion sein könnte. In dieser Arbeit wurden Grundlagen geschaffen, um das RNase P/MRP-System in Pflanzen genauer zu verstehen und zu untersuchen.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
^{32}P	Phosphorradiounuklid
AA:BisAA	Acrylamid/Bisacrylamid
ad	auffüllen auf
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure(n)
<i>Ath</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP, A	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
Cam ^R	Reistenzgen für Chloramphenicol
cDNA	copyDNA, DNA-Kopie von RNA
Ci	Curie
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
COR	Core Region, konservierte Region
cpm	<i>counts per minute</i> , Zähler pro Minute
Cs ₂ SO ₄	Cäsiumsulfat
CsCl	Cäsiumchlorid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP, C	Cytidintriphosphat
CyRPR	RNase P RNA aus den Cyanellen von <i>Cyanophora paradoxa</i>
Da	Dalton
dATP, A	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP, C	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP, G	Desoxyguanosintriphosphat
DMP	Dimethylpimelimidat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
dpm	<i>desintegration per minute</i> , radioaktive Zerfälle pro Minute
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP, T	Desoxythymidintriphosphat
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 Nanometer
ε ₂₈₀	Absorptionskoeffizient bei 280 Nanometer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i> , RNA-Sequenzen
et al.	Et alii (lat.), und andere
EtBr	Ethidiumbromid

EtOH	Ethanol
FA-Gel	Formaldehydgel
fmol	Femtomol
GlauRPR	RNase P RNA aus <i>Glaucozystis nostochinearum</i>
GTP, G	Guanosintriphosphat
GuaHCl	Guanidiniumchlorid
H1-RNA	RNase P RNA aus Homo sapiens
H ₃ BO ₃	Borsäure
HCl	Salzsäure
HOAc	Essigsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
IgG	Immunglobulin
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kB	Kilobase(n), 1 kB entspricht 1000 Nt
kBp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOAc	Kaliumacetat
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar (Mol pro Liter)
M1-RNA	RNase P RNA aus <i>Escherischia coli</i>
mA/cm ²	Einheit der Feldstärke: Milliampere pro Quadratzentimeter
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
Mg	Magnesium
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MIPS	Munich Information Center for Protein Sequences
mM	Millimolar (Millimol pro Liter)
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MRPR	RNase MRP RNA
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> , Ausschlußgrenze
n x g	n-fache Erdbeschleunigung
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NADH	Nikotinamidadeninnukleotid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaIR	Nalidixinsäureresistenz
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid

NBT	p-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid
ncRNA	<i>noncoding</i> RNA, nichtkodierende RNA
NH ₄	Ammoniak
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
Ni	Nickel
Nt	Nukleotide
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , Leseraster
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline, Salzlösung in Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	pondus hydrogenii
pI	Isoelektrischer Punkt
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
POP	Processing Of Precursor, RNase P/MRP-Untereinheit
pre-tRNA	Vorläufer-tRNA
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPP	RNase P Protein
RPR	RNase P RNA
RT	Raumtemperatur
RTase	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkription
S	Einheit des Sedimentationskoeffizienten: Svedberg
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
StrR	Streptomycinresistenz
t _{1/2}	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle(n)
TAE	Tris-Acetate-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tris-Borat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline, Salzlösung in Trispuffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tertamethylendiamin
TG	Tris-Glycin
TGE	Tris-Glycin-EDTA

T _h	Hybridisierungstemperatur
TIM	Triosephosphat-Isomerase
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> RNA
TSS	<i>transformation and storage solution</i>
Tyr	Tyrosin
U	Unit, Enzymeinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTP, U	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
XCFE	Xylencyanol FF
Zn	Zink

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Einleitung	15
1.1	Die Ribonuklease P: ein ubiquitäres Enzym mit essentieller Funktion	15
1.2	Bakterielle RNase P	16
1.2.1	Struktur und Funktion der bakteriellen RNase P RNA	16
1.2.2	Struktur und Funktion des bakteriellen RNase P Proteins	18
1.2.3	Reaktionsmechanismus der RNase P	19
1.2.4	Substraterkennung in bakterieller RNase P	21
1.3	RNase P in Archaea	23
1.4	Eukaryotische RNase P	27
1.4.1	Zusammensetzung der eukaryotischen nukleären RNase P	29
1.4.1.1	Die eukaryotische RNase P RNA	29
1.4.1.2	Eukaryotische RNase P Proteine	31
1.4.2	Spezielle Funktion der eukaryotischen RNase P Proteine	31
1.4.3	Lokalisation der RNase P und ihrer Untereinheiten	35
1.4.4	Die nukleäre RNase P in Pflanzen	35
1.5	RNase P in Organellen	36
1.5.1	Mitochondriale RNase P	36
1.5.1.1	Die mitochondriale RNase P in Hefe	36
1.5.1.2	Die humane mitochondriale RNase P	37
1.5.2	RNase P in Plastiden	38
1.6	RNase MRP	39
1.6.1	RNase MRP RNA	40
1.6.2	RNase MRP Proteine	41
1.7	Zielsetzung der Arbeit	42
2.	Material	43
2.1	Biologisches Material	43
2.1.1	Antikörper	43
2.1.2	Bakterien	43
2.1.3	Pflanzenmaterial	44
2.2	Molekularbiologisches Material	44
2.2.1	Plasmidvektoren	44
2.2.2	Enzyme	46
2.2.3	Oligodesoxynukleotide	46
2.2.4	Längenstandards	48
2.3	Chemikalien	48
2.4	Kits	49
2.5	Software, Programme, Datenbanken	49
2.6	Laborgeräte	49
3.	Methoden	51
3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	51
3.1.1	Fällung von Nukleinsäuren	51

3.1.1.1	Ethanolfällung von Nukleinsäuren	51
3.1.1.2	Isopropanolfällung von Plasmid-DNA	51
3.1.2	Entfernung niedermolekularer Substanzen aus Nukleinsäurelösungen	52
3.1.3	Reinigung von Nukleinsäurelösungen durch Phenolextraktion	52
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	52
3.1.4.1	Spektrofotometrische Konzentrationsbestimmung	52
3.1.4.2	Konzentrationsabschätzung mittels interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe	53
3.1.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismen	53
3.1.5.1	Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab	53
3.1.5.2	Maxi-Plasmid-Präparation	54
3.1.6	Präparation genomischer DNA aus Pflanzen	54
3.1.7	Präparation von RNA aus Pflanzen	55
3.1.7.1	Isolierung von mRNA aus einer <i>Arabidopsis thaliana</i> RNA-Präparation	56
3.1.7.2	Isolierung löslicher nichtkodierender RNAs (ncRNA)	57
3.1.7.3	Fraktionierung einer Gesamt-RNA Präparation aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
3.1.8	<i>In vitro</i> Transkription mit T7-RNA-Polymerase	58
3.1.8.1	Nichtradioaktive <i>in vitro</i> Transkription	58
3.1.8.2	Radioaktive T7-Transkription	59
3.1.8.3	Berechnungen zur Radioaktivität	59
3.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	60
3.2.1	Native Agarosegelelektrophorese	60
3.2.2	Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von RNA	61
3.2.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Analyse von Nukleinsäuren	62
3.2.4	Detektion von Nukleinsäuren im Gel	62
3.2.4.1	Lokalisierung durch Fluoreszenzlöschung	62
3.2.4.2	Lokalisierung durch Toluidinblaufärbung	63
3.2.4.3	Lokalisierung durch Färbung mit Ethidiumbromid	63
3.2.5	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	64
3.2.6	Elution von Nukleinsäuren aus denaturierenden Polyacrylamidgelen	64
3.3	Nukleinsäure-Amplifizierung	64
3.3.1	Polymerase-Kettenreaktion	64
3.3.2	Kolonie-PCR	65
3.3.3	Mutagenese von DNA mittels der QuikChange-Strategie	65
3.3.4	Sequenzierung von DNA	66
3.3.5	Berechnung der Schmelztemperatur von DNA	66
3.4	Analyse von RNA	66
3.4.1	Herstellung von RNase-freiem Wasser mit DEPC	67
3.4.2	Identifizierung von Nukleinsäuren durch Hybridisierung	67
3.4.2.1	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	67
3.4.2.2	Dot-Blot von RNA	68
3.4.2.3	Kapillar-Transfer von RNA auf eine Membran (Northern Blot)	68
3.4.2.4	Elektrophoretischer Transfer von RNA auf eine Membran	69
3.4.2.5	Hybridisierung einer Membran mit einer radioaktiven ssDNA-Sonde	70
3.4.2.6	Quantifizierung von Gelbanden/ Bestimmung von Bindungskonstanten	71
3.4.3	Herstellung von cDNA	72
3.4.4	Bestimmung von RNA-Enden	73

3.4.4.1	Polyadenylierung von RNA	73
3.4.4.2	Bestimmung der 3'-Enden von RNA	74
3.4.4.3	Bestimmung der 5'-Enden von RNA	75
3.5	Klonierung von DNA	75
3.5.1	Enzymatische Hydrolyse von DNA	75
3.5.2	Dephosphorylierung von DNA	76
3.5.3	Phosphorylierung von DNA	76
3.5.4	Ligation von DNA-Molekülen	77
3.5.4.1	Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase	77
3.5.4.2	Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem TOPO TA Cloning Kit	77
3.5.5	Transformation von <i>E. coli</i> mit Fremd-DNA	78
3.5.5.1	Herstellung von chemokompetenten Zellen	78
3.5.5.2	Transformation chemisch kompetenter Zellen	79
3.6	Expression heterologer Proteine in <i>E. coli</i>	79
3.6.1	Überexpression im analytischen Maßstab	79
3.6.2	Überexpression im präparativen Maßstab	79
3.6.3	Allgemeine Methoden der Proteinbiochemie	80
3.6.3.1	Silanisieren von Gefäßen	80
3.6.3.2	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	80
3.6.3.3	Proteinfällung mit Methanol/Aceton	81
3.6.3.4	Renaturierung durch Dialyse	81
3.6.3.5	Proteinreinigung durch Metallaffinitätschromatografie	82
3.6.4	Abspaltung des N-terminalen His ₆ -Fusionspeptides	83
3.7	Charakterisierung von Proteinen	84
3.7.1	Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen	84
3.7.2	Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen	86
3.7.3	Dokumentation von Proteingelen	87
3.7.3.1	Coomassie-Blau-Färbung	87
3.7.3.2	Trocknen von Polyacrylamidgelen	87
3.7.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford	87
3.7.5	Bestimmung von Proteinkonzentrationen durch UV-Messung	88
3.7.6	Untersuchung von Protein-RNA-Wechselwirkungen	89
3.7.7	Western Blot	90
3.7.7.1	Übersichtsfärbung mit Ponceau S	92
3.7.7.2	Immunologischer Nachweis durch Antikörper- gekoppelte Enzyme	92
3.7.8	Präparation prozessierungsaktiver Extrakte aus Pflanzen	93
3.7.8.1	Präparation eines S23-Proteinextraktes aus Weizenkeimen	93
3.7.8.2	Präparation eines S23-Proteinextraktes aus Blumenkohl	94
3.7.9	Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität aus Weizenkeimextrakt	94
3.7.9.1	Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose	94
3.7.9.2	Immunopräzipitation aus Weizenkeimextrakt	95
3.7.9.3	Elution der immunopräzipitierten Proteine	96
3.7.10	Präparation von IgG aus Kaninchenserum durch Ammoniumsulfatfällung	96
3.7.10.1	Entfernung von <i>E. coli</i> -spezifischen Antikörpern aus einer IgG-Präparation	97
3.7.10.2	Handhabung von Antikörpern	98
3.8	Prozessierung von Vorläufer-tRNA	98
3.8.1	<i>In vitro</i> Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P RNA	98

3.8.2	<i>In vitro</i> Prozessierung von pre-tRNA mit immunopräzipitierten Enzympräparaten	99
4.	Ergebnisse	100
4.1	Konstruktion von Transkriptionsklonen zur Präparation von RNase MRP RNAs aus <i>A. thaliana</i>	100
4.2	Analyse der RNase MRP RNA-Expression in <i>A. thaliana</i>	101
4.2.1	Nachweis der RNase MRP RNAs durch RT-PCR	103
4.2.2	Nachweis von RNase P/MRP RNAs durch Northern Blot	104
4.2.3	Bestimmung des 5'-Endes der RNase MRP RNAs	105
4.2.4	Ribozymreaktion mit RNase MRP RNAs aus <i>A. thaliana</i>	107
4.3	Analyse der Genprodukte von <i>A. thaliana</i> RNase P/MRP-Proteingenen	108
4.3.1	Analyse der Transkriptions- und Translationsprodukte von AtPOP1	108
4.3.1.1	Bestimmung des 3'-Terminus von AtPOP1-mRNA	108
4.3.1.2	Bestimmung des 5'-Terminus der AtPOP1-mRNA	110
4.3.1.3	Nachweis von POP1-mRNA im Northern Blot	111
4.3.1.4	<i>In silico</i> -Analyse der Primärsequenz von AtPOP1p	112
4.3.2	Analyse der Transkriptions- und Translationsprodukte von AtRpp30	113
4.3.2.1	Klonierung der AtRpp30-mRNA und Analyse des Spleißmusters	113
4.3.2.2	Bestimmung des 3'-Terminus der AtRpp30-mRNA	113
4.3.2.3	Bestimmung des 5'-Terminus der AtRpp30-mRNA	115
4.3.2.4	<i>In silico</i> -Analyse der Sequenz- und Strukturhomologien von AtRpp30p	117
4.3.3	Analyse der Transkriptions- und Translationsprodukte von AtRpp38	119
4.3.3.1	Bestimmung des 3'-Terminus der AtRpp38-mRNAs	119
4.3.4	Analyse der Transkriptions- und Translationsprodukte von AtRpp29	120
4.3.4.1	Bestimmung des 3'-Terminus der AtRpp29-mRNA	120
4.3.4.2	Nachweis der AtRpp29-mRNA durch Northern Blot	122
4.4	Präparation der rekombinanten RNase P/MRP Proteine aus <i>A. thaliana</i>	123
4.4.1	Proteinisolierung durch Ni ²⁺ -Affinitätschromatografie	123
4.4.2	Präparative Reinigung von AtPOP1p	123
4.4.2.1	Präparative Reinigung von AtRpp30p	125
4.4.2.2	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen AtRpp30p	127
4.4.2.3	Präparative Reinigung von AtRpp38p	127
4.5	Gelelektrophoretische Analyse von Protein-RNA-Komplexen	129
4.5.1	Renaturierung von strukturierten RNAs	129
4.5.2	Optimierung der Komplexbildungs-Bedingungen	130
4.5.3	Komplexbildung von AtPOP1p mit MRPR1	131
4.5.3.1	Bestimmung der Bindungskonstanten von AtPOP1p zu MRPR1	133
4.5.3.2	Bindung von AtPOP1p an MRPR-Varianten und pre-tRNA	135
4.5.4	Komplexbildung von AtRpp38p und MRPR1	137
4.5.4.1	Spezifität der Komplexbildung zwischen AtRpp38p und MRPR1	138
4.5.4.2	Bestimmung der Bindungskonstanten von AtRpp38p zu MRPR1	139
4.5.4.3	Bindung von AtRpp38p an MRPR-Varianten und pre-tRNA	142
4.5.4.4	Komplexbildung zwischen AtRpp38p, MRPR1 und pre-tRNA ^{Tyr}	143
4.5.5	Untersuchung der Bindung von AtRpp30p und MRP RNA	144
4.5.6	Bindung von AtRpp29p an <i>A. thaliana</i> RNase MRP RNA	145
4.5.7	Untersuchung der Bindung zwischen AtRpp14p und MRPR	145
4.5.8	Bindung mehrerer Proteine an <i>A. thaliana</i> RNase MRP RNA	146

4.6	Nachweis von RNase P/MRP Proteinen in Pflanzenextrakten	147
4.6.1	Optimierung der Semi-Dry-Blot-Bedingungen auf eine PVDF-Membran	147
4.6.2	Nachweis von AtPOP1p durch Western Blot	148
4.6.3	Nachweis von AtRpp30p im Western Blot	152
4.6.4	Nachweis von AtRpp38p durch Western Blot	153
4.6.5	Nachweis von AtRpp29p durch Western Blot	154
4.7	Identifikation von RNase MRP RNAs in anderen Pflanzen	155
4.7.1	Analyse der MRP RNA aus Weizen	158
4.7.2	Nachweis der Weizen MRP RNA in gereinigter RNase P	159
4.8	Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität aus S23-Weizenkeimextrakt	160
4.8.1	Nachweis der Weizen RNase MRP RNA in RNase P-aktiven Immunopräzipitaten	162
4.8.2	Analyse der RNA-Population in RNase P-aktiven Immunopräzipitaten	163
5.	Diskussion	164
5.1	Die RNase MRP RNAs in <i>Arabidopsis thaliana</i>	164
5.2	RNase P/MRP RNA in Weizenkeimen	170
5.3	Gibt es eine RNase P-RNA in Pflanzen?	170
5.4	Klonierung der RNase P/MRP Proteine und Analyse der Expression <i>in vivo</i>	172
5.4.1	Genstruktur und Expression von AtPOP1	172
5.4.2	Funktion von AtPOP1p	174
5.4.3	Genstruktur und Expression von AtRpp30	177
5.4.4	Funktion von AtRpp30p	178
5.4.5	Genstruktur und Expression von AtRpp38	179
5.4.6	Die Funktion von AtRpp38p	180
5.4.7	Genstruktur und Expression von AtRpp29p	182
5.4.8	Die Funktion von AtRpp29p	183
6.	Ausblick	185
7.	Zusammenfassung	187
8.	Summary	189
9.	Literaturverzeichnis	191
10.	Abbildungsverzeichnis	212
11.	Tabellenverzeichnis	215
12.	Anhang	216
	Curriculum Vitae	266
	Verzeichnis der Publikationen	268
	Stipendien	269
	Selbstständigkeitserklärung	269
	Danksagung	271

1. Einleitung

1.1 Die Ribonuklease P: ein ubiquitäres Enzym mit essentieller Funktion

Die Endonuklease RNase P ist eines der für die Reifung der tRNAs essentiellen Enzyme. Neben ihrer Hauptfunktion als Adaptermoleküle bei der Translation sind tRNAs in verschiedenen Regulations- und Biosynthesewegen involviert. In allen Organismen werden tRNAs als Vorläufermoleküle (pre-tRNA) synthetisiert. Nach der Transkription werden diese durch verschiedene Reaktionen in ihre aktive Form überführt. Dabei werden 3'- und 5'-flankierende Sequenzen abgespalten, Introns entfernt, Basen modifiziert und das 3'-CCA-Ende generiert.

In einer Mg^{2+} -abhängigen SN_2 -Reaktion katalysiert die RNase P die Hydrolyse einer spezifischen Phosphodiesterbindung und generiert neben der frei werdenden 5'-Flanke mit einer 3'-Hydroxylgruppe das reife, phosphorylierte 5'-Ende der tRNA.

Als ubiquitäres Enzym existiert RNase P in allen Organismen sowie den genetisch kompetenten Organellen der eukaryotischen Zelle: Kern, Mitochondrien und Chloroplasten. Eine Ausnahme stellt das Archaeobakterium *Nonoarchaeum equitans* dar, das durch Genomkondensation und Rekombination seiner tRNA-Gene den Verlust der RNase P kompensiert hat (Randau et al., 2008).

Das Enzym zeigt eine außerordentliche Variabilität in Aufbau und Funktion. In allen bisher genauer untersuchten Organismen besteht RNase P aus einer RNA-Untereinheit (RPR) und bis zu zehn Protein-Untereinheiten (Krupp et al., 1986; Bartkiewicz et al., 1989; Lee und Engelke, 1989; Morales et al., 1989; Nieuwlandt et al., 1991; Baum et al., 1996; Chamberlain et al., 1998; Jarrous et al., 1998; Jarrous und Altman, 2001). RNase P ist also wie das Spleißosom und das Ribosom ein Ribonukleoprotein. In den Chloroplasten höherer Pflanzen und Mitochondrien vielzelliger Organismen konnte bisher keine RNA-Komponente der RNase P identifiziert werden (Gegenheimer, 1996; Schön, 1996; Holzmann et al., 2008).

Schon sehr früh nach der Entdeckung des Enzyms konnte gezeigt werden, dass die bakterielle RNase P RNA *in vitro* auch in Abwesenheit der Proteinkomponente zur Abspaltung der 5'-Flanke der pre-tRNA fähig ist (Guerrier-Takada et al., 1983). Sie ist deshalb ein Ribozym. Erst kürzlich konnte das auch für die RNase P aus menschlichen Zellkernen und aus *Giardia lamblia* unter veränderten Bedingungen bewiesen werden (Kikovska et al., 2007). Die RNase P RNAs vieler Archaea und in Plastiden einzelliger Algen besitzen ebenso *in vitro* Ribozymaktivität (Pannucci et al., 1999; Li et al., 2007; Pulukkunat und Gopalan, 2008;

Li et al., 2009). Anders als die mitochondriale RNase P aus verschiedenen Hefen und Algen, die eine RNA-Untereinheit besitzen (Seif et al., 2006), ist die menschliche RNase P aus den Mitochondrien ein reines Proteinenzym mit drei Proteinuntereinheiten (Holzmann et al., 2008).

1.2 Bakterielle RNase P

Obwohl die Sequenzen der bakteriellen RPRs sehr stark variieren, gibt es starke strukturelle Gemeinsamkeiten. Alle bakteriellen RPRs besitzen Ribozymaktivität, können also die Reaktion *in vitro* unter Hochsalzbedingungen und ohne das assoziierte Protein durchführen (Guerrier-Takada et al., 1983). Das macht sie besonders interessant für funktionelle und strukturelle Untersuchungen. Das bakterielle RNase P-Holoenzym setzt sich aus einem 338-444 Nt langen RNA-Molekül, welches vom *rnpA*-Gen kodiert wird und einer 14-15 kDa großen, durch *rnpB* kodierten Protein-Untereinheit zusammen (Darr et al., 1992).

1.2.1 Struktur und Funktion der bakteriellen RNase P RNA

Alle bekannten bakteriellen RPRs lassen sich in eine der beiden Strukturklassen einordnen. Klasse A wird oft als ursprünglicher Typ bezeichnet und von der M1-RNA aus *E. coli* repräsentiert (Abb. 1, links). Die Klasse B wird durch die RPR aus *B. subtilis* repräsentiert (Abb. 1, rechts). Alle RNAs lassen sich in zwei unabhängige Domänen einteilen, die Spezifitätsdomäne (S-Domäne) und die Katalysedomäne (C-Domäne). Sie werden von typischen Stapeln helikaler Bereiche geformt, die über Fernwechselwirkungen stabilisiert werden (Abb. 2). Eine Minimalstruktur wird von allen RNAs geteilt und besitzt noch katalytische Aktivität (Siegel et al., 1996). Die Basen innerhalb dieser Minimalstruktur sind gut konserviert, jedoch sind die meisten der konservierten Basen innerhalb diskreter Regionen (*core region*: CRI, II, III, IV, V) zu finden. Während CRII, III und IV zwischen den Helices liegen, bilden CRI und CRV zusammen die Helix P4. Die variablen Sequenzen und Strukturelemente innerhalb der RNA scheinen nur zur Stabilisierung der Gesamtstruktur beizutragen. Dies wird dadurch bestätigt, dass die minimale Sequenz eine relativ instabile Tertiärstruktur ausbildet (Siegel et al., 1996). Die Tertiärstruktur wiederum lässt die beiden Klassen gut unterscheiden. Dies spiegelt sich insbesondere bei den weniger gut konservierten Regionen wider. So werden beispielsweise die Stabilisierungen durch P12 und P13 des Typ A durch P12 und P10.1 in Typ B übernommen (Krasilnikov et al., 2004). Beide Klassen unterscheiden sich hauptsächlich durch die primäre Lage von P6 und die unterschiedliche Ausdehnung von P10.1 (Haas et al., 1996).

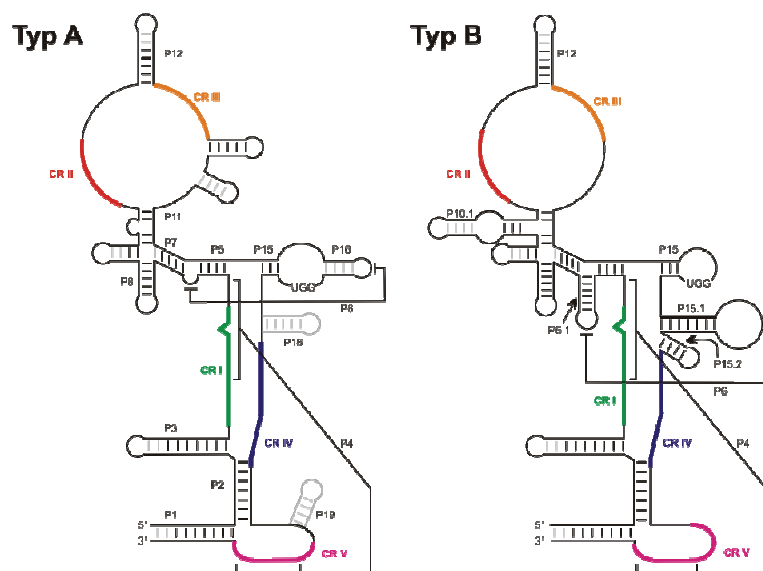


Abb. 1: Schematische Sekundärstrukturdarstellung der Typ A bzw. Typ B RNase P RNAs

Die universal, auch in Eukaryoten, konservierten Elemente CRI bis CRV sind farbig dargestellt; P18 und P19 in grau, da sie nicht zwingend konserviert sind. Die minimale Zahl an Basenpaarungen pro Helix ist durch dicke, schwarze Linien repräsentiert, Abweichungen hiervon in grau. Die Fernwechselwirkungen P4 und P6 sind durch Linien angedeutet. Das 3'-CCA-Substratbindungsmotiv GGU in L15 bzw. J16-15 ist durch Buchstaben repräsentiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in Struktur B nur die sich von A unterscheidenden Strukturelemente benannt (Abb. nach Schön, 1999).

Bisher konnten die räumlichen Strukturen zweier bakterieller RPRs kristallografisch bestimmt werden. Die erste Struktur entspricht der Typ A-RPR und stammt aus *Thermotoga maritima* (Torres-Larios et al., 2005), die zweite Struktur ist die Typ B-RPR aus *Bacillus stearothermophilus* (Kazantsev et al., 2005). Die Strukturen der S-Domänen weichen voneinander ab, die der C-Domänen sind hoch konserviert. Auch ist die Struktur der P15-Domäne nur schlecht aufgelöst. NMR-basierte Strukturen und biochemische Analysen zeigten jedoch, dass die P15-Region bei beiden ähnlich strukturiert ist (Glemarec et al., 1996; Kufel und Kirsebom, 1998). Die Bedeutung der Region für die Aktivität wurde durch Deletionsversuche gezeigt, bei denen sich k_{obs} um den Faktor 10^3 verringerte (Kikovska et al., 2007). Anders als eukaryotische RNase P RNAs enthalten die meisten bakteriellen RPRs in J16-15 das GGU-Motiv, das eine Bindung der RPR an das 3'-CCA der tRNAs ermöglicht (Kufel und Kirsebom, 1998). Obwohl dieses Motiv in der Mehrheit der cyanobakteriellen RPRs nicht zu finden ist, sind diese ebenfalls in der Lage, das 3'-CCA der pre-tRNAs zu erkennen (Hess et al., 1998). Für die RNase P aus *B. subtilis* konnten zwei RNA-Untereinheiten im Komplex ermittelt werden (Fang et al., 2001).

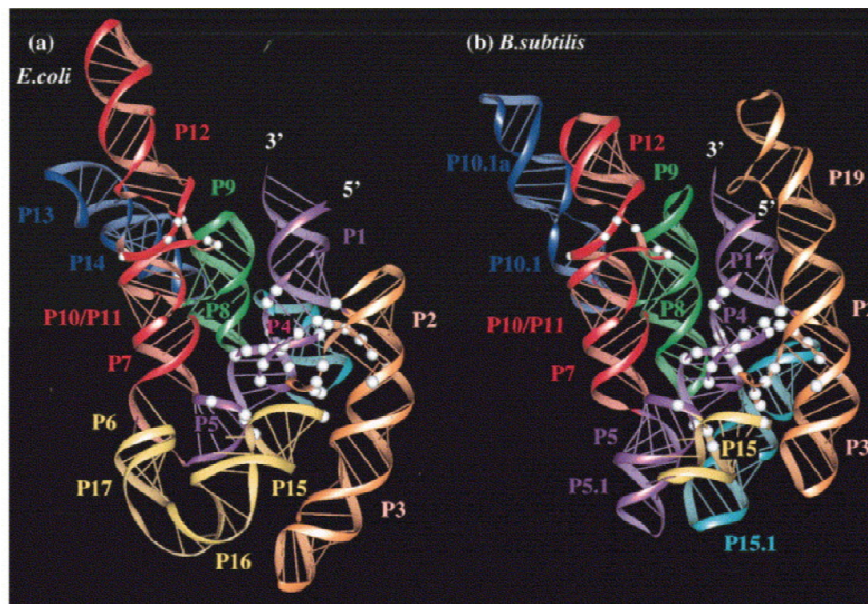


Abb. 2: Raumstrukturmodelle der RNase P RNAs aus *E. coli* und *B. subtilis*

Gezeigt sind Raumstrukturmodelle der RNase P RNA für *E. coli* (a) und *B. subtilis* (b). Helices der S-Domäne sind jeweils rot, grün und dunkelblau gefärbt; die der C-Domäne türkis, gelb, orange und hellblau. Hoch konservierte Nukleotide im katalytischen Zentrum sind als große weiße Kugeln dargestellt. Kleine weiße Kugeln repräsentieren konservierte Nukleotide der T-Loop-Erkennungsstelle in der pre-tRNA (Massire et al., 1998).

1.2.2 Struktur und Funktion des bakteriellen RNase P Proteins

Die Sequenzähnlichkeit der RNase P Proteine verschiedener Eubakterien ist mit ca. 15 % sehr gering. Nur ein kurzes Peptid innerhalb der Aminosäuresequenz ist stark konserviert. Seine vorwiegend aus basischen und aromatischen Aminosäuren zusammengesetzte Sequenz ist für Interaktionen mit der RNA-Untereinheit verantwortlich (Gopalan, 1997; Altman et al., 2000). Das bakterielle Protein bindet die 5'-Flanke der tRNA-Vorläufermoleküle und erhöht so die Bindungsaffinität des Substrats (Niranjanakumari et al., 1998; Sun et al., 2006). So kann das Protein schwächere RPR-tRNA Interaktionen, die durch unterschiedliche pre-tRNA-Strukturen entstehen, verstärken. Weitere Rollen des bakteriellen Proteins sind die Produktfreisetzung, Erkennung der Spaltstelle, Erweiterung der Substratspezifität, die Stabilisierung der RPR Struktur und Erhöhung der Affinität des Metallions bei der Katalyse (Tallsjö und Kirsebom, 1993; Liu und Altman, 1994; Buck et al., 2005a/b; Sun und Harris, 2007). Für RNase P-Aktivität *in vitro* ist das Protein nicht notwendig, *in vivo* sind jedoch beide Untereinheiten essentiell (Schedl und Primakoff, 1973; Stark et al., 1978; Guerrier-Takada et al., 1983; Reich et al., 1988).

Die Strukturen der RNase P Proteine von *B. subtilis*, *S. aureus* und *T. maritima* konnten durch NMR und Röntgenkristallstrukturanalysen bestimmt werden (Stams et al., 1998; Spitzfaden

et al., 2000; Kazantsev et al., 2003). Sie zeigen eine ähnliche Faltung, obwohl die Sequenzähnlichkeiten nur sehr gering sind. Alle drei Proteine bilden ein $\alpha\beta\beta\alpha\beta$ *sandwich fold* aus, das in der Anordnung $\alpha\beta\beta\alpha\beta$ zu einer globulären Struktur führt (Abb. 3). Die Dimerisierung des *T. maritima* Proteins soll zur Thermostabilität des Proteins vor der Assemblierung mit der RNA beitragen (Kazantzev et al., 2003).



Abb. 3: Struktur des RNase P Proteins in *Bacillus subtilis*

Die Topologie des Proteins wird als $\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Struktur angegeben. Die Abbildung zeigt das ungewöhnliche Strukturmotiv des RNase P Proteins: eine linksgängige $\beta\alpha\beta$ kreuzende Überbrückung von β -Strang 3 über Helix B zu β -Strang 4. Die konservierten Aminosäuren enthaltende Helix ist rot dargestellt. Für sie wird wie für die Schleife mit sauren Aminosäuren (grün) eine RNA-Bindungsfunktion postuliert. Aminosäuren, welche zur Wechselwirkung mit dem pre-tRNA-Substrat beitragen, sind gelb hervorgehoben. Die Dimensionen des Proteins im Kristall betragen 40 x 35 x 30 Å (Stams et al., 1998; PDB: 1A6F).

1.2.3 Reaktionsmechanismus der RNase P

Anders als die bekannten Ribozyme der Gruppe I/II-Introns und Hammerhead-Ribozyme, die jeweils eine Reaktion *in cis* durchführen können, katalysiert RNase P mehrere Reaktionen *in vivo* und *in trans*. RNase P katalysiert eine direkte Hydrolyse (Smith und Pace, 1993), für die ein metallionenabhängiger SN_2 -Mechanismus diskutiert wird (Reich et al., 1988; Steitz und Steitz, 1993; Warnecke et al., 1999). Guerrier-Takada et al. (1986) postulieren einen SN_2 -Mechanismus, in welchem der nukleophile Angriff eines H_2O -Moleküls auf das Phosphatrückgrat durch einen Komplex aus Magnesiumionen und 6 H_2O -Molekülen unterstützt wird (Abb. 4). An der Katalyse durch M1-RNA sind mindestens zwei Magnesiumionen beteiligt, von denen eines an die M1-RNA koordiniert. Das zweite Ion bindet an das Substrat und aktiviert dieses, bevor es zur Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes kommt (Perreault und Altman, 1993). Während der Katalyse übernimmt die bakterielle RNA-Untereinheit zwei Aufgaben. Zum einen positioniert sie die pre-tRNA mit der 5'-Flanke in der katalytischen Domäne, unabhängig von vorhandenen zweiwertigen Ionen. Zum anderen erleichtert die RNA die Spaltungsreaktion, indem sie die notwendigen Mg^{2+} -Ionen zur Verfügung stellt (Kufel und Kirsebom, 1998; Smith und Pace, 1993). Neben Mg^{2+}

können auch andere zweiwertige Ionen wie z.B. Ca^{2+} und Pb^{2+} an die RNA binden. Die ähnliche Bindungsaffinität von Ca^{2+} und Mg^{2+} ermöglicht eine regulierende Funktion, da die Umsatzrate direkt vom Verhältnis $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ abhängt (Brännvall und Kirsebom, 2001). Bei Substitution von Mg^{2+} durch Ca^{2+} findet aber nahezu kein Substratumsatz statt (Smith et al., 1992). Die Mg^{2+} -Ionen spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Struktur der RNA, insbesondere der P15-Schleife und des GGU-Motivs, das in Typ A-RNAs mit der 3'-terminalen RCCA-Sequenz der pre-tRNA interagiert (Kufel und Kirsebom, 1998). Während der Reaktion übernehmen Magnesiumionen mehrere Funktionen: durch Koordination ermöglichen sie die Deprotonierung von H_2O -Molekülen; sie polarisieren Phosphorylsauerstoffatome und ermöglichen so einen nukleophilen Angriff auf das korrespondierende Phosphoratom bei gleichzeitiger Stabilisierung des Übergangszustands.

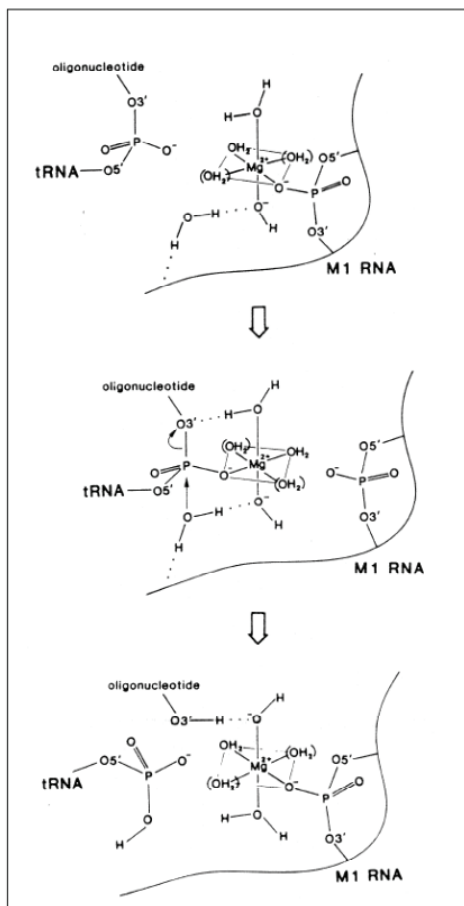


Abb. 4: Mechanismus der RNase P-Reaktion

Der Reaktion wird mittels eines Mg^{2+} - H_2O -Komplexes katalysiert, der durch ein Phosphat im Rückgrat der RNase P RNA gebunden wird. Das Mg^{2+} ist hexakoordiniert, kann aber auch tetrakoordiniert sein, das durch die Klammern um die H_2O -Moleküle dargestellt ist. Ein freies H_2O -Molekül polarisiert das 5'-Phosphat in der pre-tRNA. Der Übergangszustand dieses Phosphates ermöglicht den nukleophilen Angriff eines weiteren H_2O -Moleküls. Dabei wird das 3'-OH der 5'-Flanke und das reife 5'-Ende der tRNA gebildet (Guerrier-Takada et al., 1986).

Neben den Mg^{2+} -Ionen ist auch H_2O an der Positionierung der Sauerstoffatome der Phosphodiestergruppe beteiligt. Es bildet sich ein trigonal-bipyramidaler Übergangszustand, in dem die Phosphor-Sauerstoff-Bindungen stärker polarisiert sind. Der Phosphor wird dadurch schwach elektropositiv geladen, was den nukleophilen Angriff eines Hydroxidions begünstigt (Perreault und Altman, 1992). Mit steigendem pH erhöht sich deshalb auch die Umsatzrate der Reaktion.

1.2.4 Substraterkennung in bakterieller RNase P

Neben den typischen tRNA-Vorläufern, von denen bis zu mehrere hundert verschiedene Spezies in einer Zelle existieren können, sind noch weitere Substrate bekannt, die für die bakterielle RNase P in Frage kommen. Diese sind beispielsweise 4,5S RNA (Peck-Miller und Altman, 1991), Bakteriophage ϕ 80-induzierte RNA (Bothwell et al., 1976), die 3'-Termini genomischer RNA von TYM-Viren (Guerrier-Takada et al., 1988), tmRNA (Komine et al., 1994, Gimple und Schön, 2001), die mRNA des polycistronischen his-Operons (Alifano et al., 1994), die pre-C4 Repressor RNAs der Bakteriophagen P1 und P7 (Hartmann et al., 1995) und Übergangsstrukturen von Riboswitches (Altman et al., 2005). Obwohl deren Eigenschaften nicht sehr gut bekannt sind, haben sie alle eines gemeinsam: sie bilden eine der pre-tRNA ähnliche Struktur aus. Dies ist auch die wichtigste Eigenschaft, die für die Bindung und Erkennung des Substrates eine Rolle spielt, da es keine spezielle Erkennungssequenz gibt. Die Interaktion der RNase P RNA mit dem Substrat setzt sich aus vielen Bindungen zusammen, die über einen weiten Bereich der Oberflächen beider Moleküle wirken und sich gegenseitig verstärken (Kooperativität). Die notwendigen minimalen Strukturen im Substrat sind der Akzeptorstamm und der Pseudouridinstamm/-Loop.

Im Einzelnen konnten durch biochemische Analysen direkte Interaktionen zwischen der T-stem-loop-Region der pre-tRNA und dem helikalen Bereich P7-P11 mit der adeninreichen Ausbuchtung (ungepaarte Region) zwischen P10 und P11 der Spezifitätsdomäne (Harris et al., 1994, Pan et al., 1995, Pan und Jakacka, 1996) gezeigt werden. Die Basenpaarungen zwischen dem RCCA-3'-Terminus der pre-tRNA und dem GGU-Motiv in der P15-Domäne (Kirsebom und Svärd, 1994; Oh und Pace, 1994; Svärd et al., 1996; Oh et al., 1998; Wegscheid und Hartmann, 2006 und 2007) sowie die A₂₄₈/N₋₁ Assoziation, bei der die erste Base vor der Spaltstelle mit A₂₄₈ in der RNase P RNA (*E. coli*) interagiert (Brännvall et al., 2002; Zahler et al., 2003; Brännvall und Kirsebom, 2005), verankern das Substrat in der RNase P RNA, exponieren die Spaltstelle und führen so zur korrekten Spaltung (Abb. 5). Crosslink-Versuche und *nucleotide analog interference mapping*-Studien (NAIM) zeigten, dass mehrere Nukleotide (A₂₄₈, A₂₄₉, C₂₅₂, C₂₅₃, G₃₃₂, A₃₃₃; *E. coli*) der RNase P RNA eine Art Bindungstasche für N₋₁ des Substrates ausbilden, in der A₂₄₈ eine Schlüsselstellung einnimmt, da U am häufigsten in N₋₁ der pre-tRNAs anzutreffen ist (Kufel und Kirsebom, 1996; Christian et al., 1998; Christian und Harris, 1999; Siew et al., 1999; Heide et al., 2001; Kirsebom, 2007).

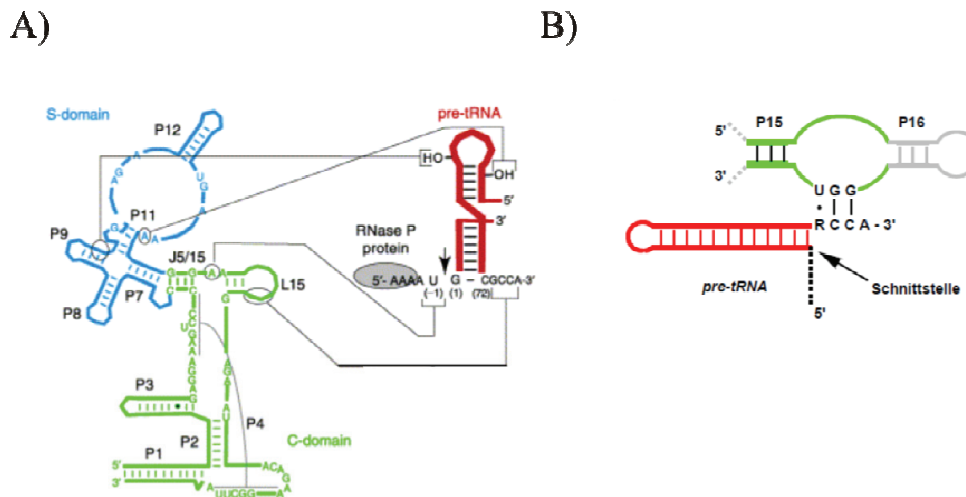


Abb. 5: Substraterkennung durch RNase P RNA

A) Bakterielle Konsensusstruktur der RNase P RNA (Harris und Christian, 2003). Konservierte Nukleotide sind durch Großbuchstaben gegeben. Die Domäne I ist blau und Domäne II ist grün dargestellt. Oben rechts sind der Akzeptor- und T-Stamm des Substrates, die von RNase P erkannt werden, schematisch gezeigt. Spezifische Elemente des Substrates, die von RNase P erkannt werden, sind in Großbuchstaben angegeben. Die Prozessierungsstelle ist durch einen Pfeil angegeben. Bekannte Interaktionen zwischen der RNase P RNA und dem Substrat sind durch Linien gezeigt, die die jeweiligen Interaktionspunkte verbinden. Die Interaktion zwischen RNase P Protein und der 5'-Flanke ist durch ein Oval angedeutet.

B) Schematische Darstellung der Bindung von pre-tRNA (rot) mit dem 3'-CCA-Ende an das 5'-GGU-Bindungsmotiv der P15/P16-Bindungsregion der RNase P RNA (grün). Die Purin-Diskriminatorbase (N73) der pre-tRNA wird durch R dargestellt. Die Watson-Crick-Basenpaarungen sind durch schwarze Linien (|), die Wobble-Basenpaarung durch einen schwarzen Punkt (•) dargestellt (Kirsebom und Svärd, 1994; Schön 1999).

Die 2'-OH-Gruppen an den Positionen -1 und -2 in der 5'-Flanke und das Nukleotid +1 sind für die effiziente Spaltung unerlässlich. Während die Nukleotide der Positionen -1 und -2 wichtig für die Mg^{2+} -Bindung sind, wird durch die +1-Position die Bindung an das Ribozym erhöht und dadurch die Spaltstelle determiniert. In den meisten tRNAs ist ein G an dieser Position vorhanden (Sprinzl et al., 1998), dessen exozyklische Aminogruppe unmittelbaren Einfluss auf die Substratbindung und Mg^{2+} -Positionierung hat (Kikovska et al., 2006). Unabhängig von der Mg^{2+} -Konzentration erniedrigt sich die Reaktionsgeschwindigkeit und erhöht sich die Bindungskonstante um das Zehnfache, wenn das G•C-Paar durch U•A ersetzt wird. Eine Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration entsteht, wenn zusätzlich die N₁-Position mutiert wird. Ein C an dieser Stelle führt zu einer C₊₁•G₊₇₃-Basenpaarung, die eine Bindung an die RNase P RNA verhindert (Brännvall et al., 2003). Durch Substitutionsversuche konnte gezeigt werden, dass ein Substrat-Magnesium-Komplex das eigentliche Substrat für die RNase P darstellt (Perreault und Altman, 1992 und 1993).

1.3 RNase P in Archaea

Die RNase P RNA vieler Archaea ähnelt strukturell dem bakteriellen Typ A, wobei der Archaea-spezifische Typ M vorrangig vorkommt (Kirsebom 2007). In einigen der Typ A-RPRs konnte auch die Ribozymaktivität in Abwesenheit der Proteine *in vitro* nachgewiesen werden (Pannucci et al., 1999). Auch die RPRs des Typ M können die Spaltungsreaktion ohne Protein durchführen. Diesen mangelt es an einer stabilen Substratbindung, die durch die RNase P Proteine verbessert wird (Gopalan 2007; Kirsebom 2007; Pulukkunat und Gopalan 2008).

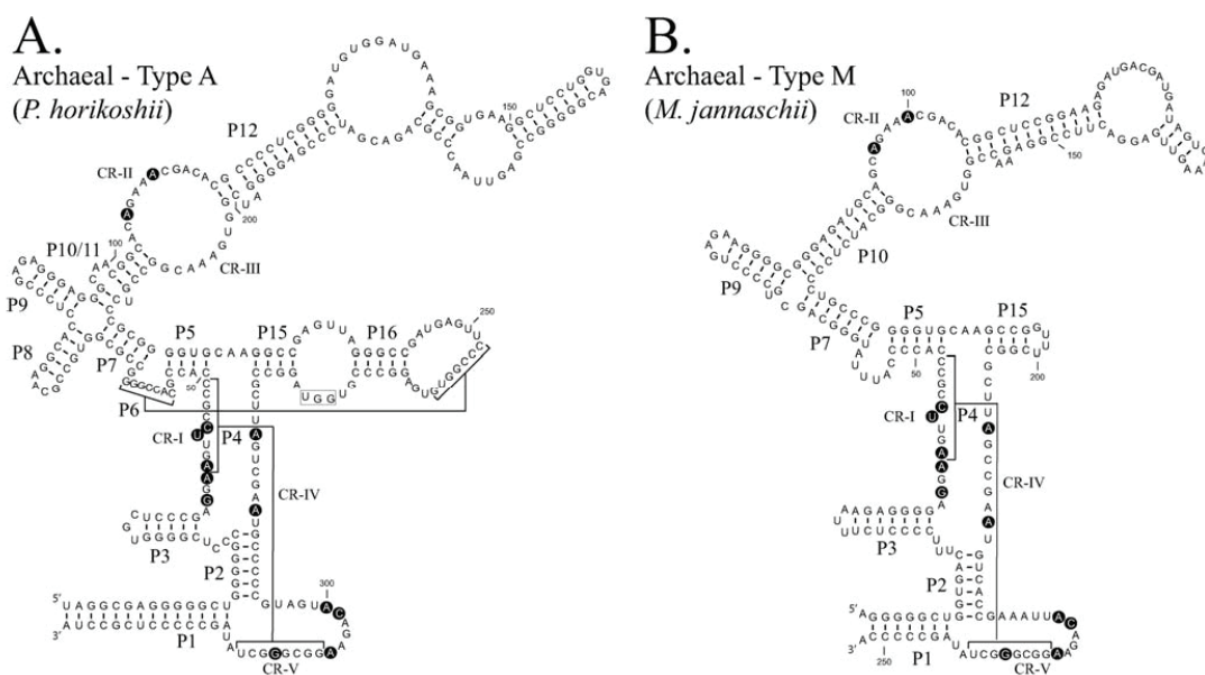


Abb. 6: Sekundärstrukturen archaebakterieller RNase P RNAs

Die Sekundärstrukturen der Typ A-RPR aus *Pyrococcus horikoshii* (A) und Typ M-RPR aus *Methanococcus jannaschii* (B) wurden nach phylogenetischen Sequenzvergleichen ermittelt (Haas et al., 1996). Konservierte Nukleotide sind mit schwarzen Kreisen unterlegt.

Archaebakterielle RNase P setzt sich aus einer RNA und bis zu 5 Proteinuntereinheiten zusammen, die starke Homologien zu den eukaryotischen Proteinen Pop4p/Rpp29p, Rpr2p/Rpp21p, Rpp1p/Rpp30p, Pop5p/hPop5p und POP3/Rpp38p zeigen (Kawano et al., 2006). Durch immunochemische Nachweise (Hall und Brown 2002) und Rekonstitutionsversuche (Kouzuma et al., 2003; Boomershine et al., 2003; Hara et al., 2011) wurde deren Identität und Notwendigkeit für die RNase P-Aktivität *in vivo* verifiziert. Da deren Strukturen kristallografisch bestimmt werden konnten, sowie wegen ihrer Verwandtschaft zu den

eukaryotischen RNase P Proteinen, sind sie besonders interessant für die Analyse von Struktur-Funktions-Beziehungen.

Die Struktur des Proteins Ph1877p/Rpp30p konnte röntgenkristallografisch ermittelt werden und ähnelt dem TIM-Barrel (Abb. 7). Seine hohe Sequenzähnlichkeit zur Cystein-Deaminase von *E. coli*, einer Metallo-Hydrolase mit TIM-Barrel-Struktur, weist auf einen gemeinsamen Vorläufer hin. Eine weitere Ähnlichkeit besteht zur tRNA-Guanin-Transglykosylase, das ebenfalls ein TIM-Barrel ausbildet. Dies lässt vermuten, dass die Fassstruktur für die tRNA-Bindung zuständig ist. Neben der tRNA bindet dieses Rpp30-Homolog auch die RPR an der Helix P8 und ersetzt vermutlich die stabilisierende Wechselwirkung P8-P18, die in der archaebakteriellen RNA fehlt (Takagi et al., 2004).

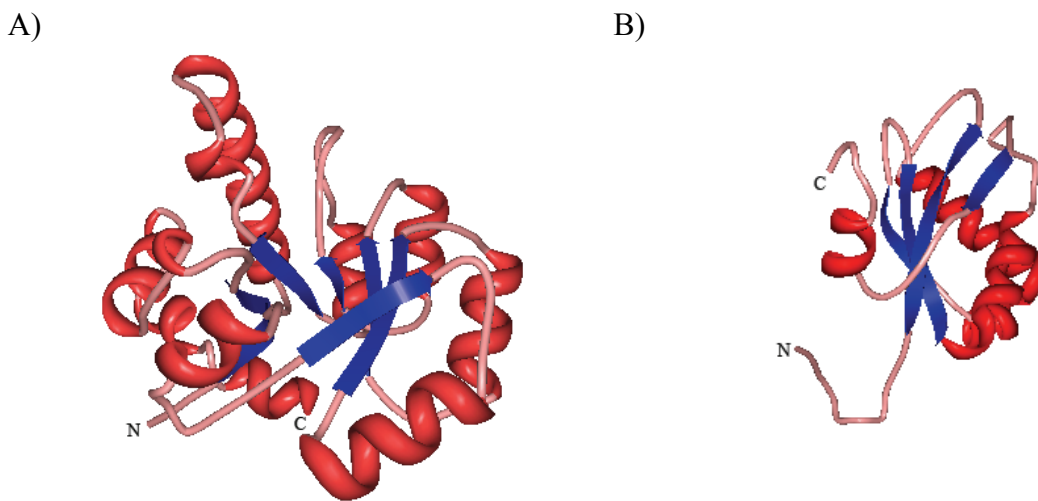


Abb. 7: Raumstrukturmodelle von RNase P Proteinen aus *Pyrococcus horikoshii*

A) Die Struktur von Ph1877/Rpp30 ist ein TIM-Barrel. Dieses enthält eine zentrale Fassstruktur aus alternierenden β - α -Sekundärstrukturen (pdb: 1V77).

B) Das Protein Ph1481/POP5 bildet eine zentral gedrehte β -Faltblattstruktur, die von hydrophoben Helices umgeben ist. Ph1481 wurde im Komplex als Heterotetramer mit Ph1877 kristallisiert (nicht dargestellt; pdb:1CZV). Blau: β -Faltblattstruktur; rot: α -Helices. Die Strukturen wurden mit PDB Protein Workshop 3.4 dargestellt.

Die Struktur des Pop5-Homologen Ph1481p ist zusammengesetzt aus fünf antiparallelen β -Faltblättern, 4 α -Helices und einer 3_{10} -Helix (Abb. 7). Sie umfasst in Ph1481p ca. 80 Aminosäuren, die eine $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$ -Struktur ausbilden. Die Anordnung der Sekundärstrukturen ähnelt der Ribonukleoprotein-Domäne (RNP auch RRM, RNP-CS, CS-RBD) vieler RNA-bindender Proteine (Burd und Dreyfuss, 1994). Das RNA-Bindungsmotiv erkennt vorwiegend ssRNA und strukturierte RNA. Die Domäne umfasst meist 90-100 Aminosäuren und wird aus zwei kurzen Sequenzen (RNP1 und RNP2) sowie mehreren konservierten hydrophoben Aminosäuren, die über die gesamte Domäne verteilt sind, gebildet. Die α -

Helices bilden dabei groß ausgedehnte hydrophobe Regionen um das zentrale Faltblatt, so dass derartige Interaktionen in zwei Richtungen ausgebildet werden können (Kawano et al., 2006). Das Protein Ph1481p bildet symmetrische Dimere, die mit Ph1877p interagieren und so ein stabiles Heterotetramer bilden können. Nur in diesem Zustand konnte dieses Protein kristallisiert werden. Da die Dimerisierung essentiell für die Funktion der RNase P ist, liegt es nahe, dass das Heterotetramer auch *in vivo* vorhanden ist und dass weitere Proteinuntereinheiten wie auch die RNA in zwei Kopien vorliegen. Ein weiterer Bindungspartner von Ph1481p ist das Protein Ph1601p/Rpp21.

Die Struktur von Ph1601p/Rpp21 ähnelt einer L-Form, die aus zwei Strukturdomänen geformt wird (Abb. 8). Der N-terminale Teil enthält zwei lange α -Helices, die parallel angeordnet sind. Die C-terminale Domäne umfasst drei antiparallele β -Faltblattstrukturen, die zusammen mit dem Verbindungsstück zwischen den beiden Domänen eine Zink-Bindedomäne ausbilden. Dabei sind vier Cysteine (C_{68} , C_{71} , C_{97} und C_{100}) an der Ausbildung der Bindungstasche beteiligt, die nach Zn^{2+} -Bindung die Anordnung der beiden Domänen zueinander stabilisiert. Mutationen dieser vier Aminosäuren zu Serin bewirkt eine strukturelle Destabilisierung sowie den Verlust der RNase P-Aktivität (Kakuta et al., 2005).

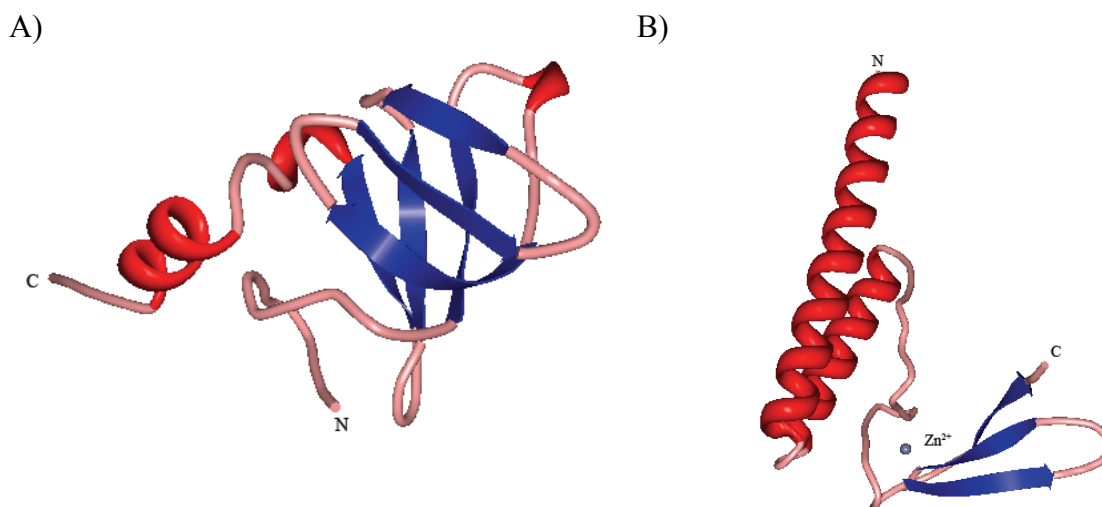


Abb. 8: Raumstrukturmodelle von RNase P Proteinen aus *Pyrococcus horikoshii*

A) Die Struktur von Ph1777/Rpp29 bildet eine Fassstruktur aus antiparallelen β -Sekundärstrukturen (pdb: 1V76).

B) Das Protein Ph1601/Rpp21 bildet eine L-Struktur aus den N-terminalen Helices und den C-terminalen β -Faltblattstrukturen (pdb: 1X0T). Blau: β -Faltblattstruktur; rot: α -Helices. Die Strukturen wurden mit PDB Protein Workshop 3.4 dargestellt.

Die Struktur von Ph1771p/Rpp29p konnte nur in Abwesenheit des 31 AS langen N-Terminus kristallografiert werden. Sie wird von einem sechssträngigen, antiparallelen β -Faltblattmotiv, einer Fassstruktur, dominiert (Sidote et al., 2004; Numata et al., 2004). Diese globuläre

Domäne formt einen hydrophoben Kern aus den stark konservierten Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin und Prolin, die auch in anderen Homologen zu finden sind. Ein besonderes Merkmal ist ein konserviertes Glycin (G₆₈, *P. horikoshii*), das unabdingbar für die Strukturbildung ist. In seiner β -Fassstruktur ähnelt Ph1771p stark den Sm-Proteinen des eukaryotischen Spleißosomapparates, obwohl die Sequenzähnlichkeit mit 12 % gering ist. Die Sm-Proteine neigen zu Homo- und Heterooligomerisierung, die sie zur ssRNA-Bindung befähigen (Kambach et al., 1999; Collins et al., 2001, Mura et al., 2001, Schumacher et al., 2002). Aus dieser Ähnlichkeit und den Strukturen von Mth11p (*Methanococcus thermophilus*) und aRpp29p (*Archaeoglobus fulgidus*) leiten sich zwei RNA-Bindungsregionen ab. Dies betrifft einen C-terminalen Cluster aus hoch konservierten, basischen Aminosäuren und den Loop zwischen β 2 und β 3 mit den stark konservierten Aminosäuren Arginin und Asparagin (R₄₄, N₄₅ in Abb. 92). Interessanterweise binden diese beiden Aminosäuren ein Sulfatanion, das für die RNA-Bindung bedeutend sein könnte (Numata et al., 2004). Da in diesen Studien das Protein mit trunkiertem N-Terminus verwendet wurde und dadurch die RNase P-Aktivität um 75 % erniedrigt war, trägt dieser vermutlich zur Bindung an die RPR oder auch pre-tRNA bei. Circular-Dichroismus-Analysen von aRpp29p weisen darauf hin, dass sich C- und N-Terminus in Lösung in einem Gleichgewicht aus Helix und unstrukturiertem Peptid befinden, der Helixanteil in Lösung beträgt nur ca. 30 %.

Kouzuma et al. (2003) zeigten, dass die Proteine Ph1481p, Ph1601p und Ph1771p zusammen mit der RNA für die pre-tRNA-Prozessierung *in vitro* essentiell sind. Ph1877p ist in der Lage, die Aktivität zu steigern. Für das Dimer aus POP5p/Rpp30p in *Methanocaldococcus jannaschii* wurde gezeigt, dass es die Prozessierungsaktivität der RNase P RNA unterstützt und eine Rolle bei der Produktfreisetzung einnimmt (Pulukkunat und Gopalan, 2008). Ein weiteres Protein (Ph1496p), das in *P. horikoshii* ursprünglich als ribosomales L7Ae-Protein identifiziert wurde, zeigt auch Ähnlichkeit mit Rpp38-Homologen. In Rekonstitutionsversuchen wurde gezeigt, dass rekonstituierte RNase P-Partikel mit Ph1496p ein höheres Temperaturoptimum (72 °C) haben, als RNase P-Komplexe ohne dieses Protein (54 °C). Durch Gelshift-Experimente wurden zwei Regionen in der RNase P RNA als Bindestellen für Ph1496p identifiziert. Diese sind die P12 sowie P15 (Kawano et al., 2006). In RNase P-Präparationen aus *P. horikoshii* konnte dieses Protein nicht nachgewiesen werden, da es stets in den Fraktionen der Ribosomen blieb.

1.4 Eukaryotische RNase P

Die Zusammensetzung der RNase P in Eukaryoten ist am besten in der Hefe *S. cerevisiae* und in *H. sapiens* untersucht; daneben gibt es auch Untersuchungen an RNase P aus *D. discoideum* (Stathopoulos et al., 1995; Marquez et al., 2005; Vourekas et al., 2007; Kalavrizioti et al., 2007) sowie aus Pflanzen (siehe Kapitel 1.4.4 und 1.5.2). Eine Übersicht der RNA- und Proteinuntereinheiten ist in Tab. 1 dargestellt. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass menschliche RNase P in Glyceringradienten einen Sedimentationskoeffizienten von 12 S besitzt (Welting et al., 2006). Das ist ein wesentliches Merkmal zur Unterscheidung von dem nahe verwandten RNase MRP-Komplex, der mit 60-80 S sedimentiert (Kiss et al., 1992; Lee et al., 1996). Beide Komplexe, RNase P und MRP, bestehen aus acht bis zehn bekannten gemeinsamen Proteinuntereinheiten, besitzen aber jeweils eine eigene RNA-Komponente (Baer et al., 1990; Topper und Clayton, 1990; Xiao et al. 2002). In Hefe konnten zwei Proteine, Snm1p und Rmp1p, als spezifische MRP Untereinheiten identifiziert werden (Schmitt und Clayton, 1994; Cai et al., 1999; Salinas et al., 2005). Das Protein Rpr2p ist als spezifische RNase P Untereinheit identifiziert worden, das nicht mit RNase MRP assoziiert ist (Chamberlain et al., 1998; Salinas et al., 2005). In Sedimentationsanalysen und Co-Immuno-präzipitationsexperimenten mit dem RNase P-Komplex aus *H. sapiens* wurde gezeigt, dass die Untereinheiten hPOP4p/Rpp29p, Rpp21p und Rpp14p vorrangig mit der RNase P assoziiert sind (Welting et al., 2006). Ältere Studien zeigten, dass die Untereinheit hPOP4 auch RNase MRP RNA (MRPR) bindet und in Hefe für die pre-rRNA-Prozessierung benötigt wird (van Eenennaam et al., 1999; Salinas et al., 2005; Welting et al., 2004). Es muss also ein intermediärer Komplex existieren, der sich von der Zusammensetzung der 12 S- (RNase P) und 60-80 S-Komplexe (RNase MRP) unterscheidet. Tatsächlich können beide Aktivitäten in 40 S-Fractionen eines Glyceringradienten gemessen werden, was einen Hinweis auf unterschiedlich zusammengesetzte Komplexe gibt.

Es wurde lange diskutiert, ob die eukaryotische RNase P wie das bakterielle Enzym verschiedene Substrate erkennt und damit auch verschiedene Funktionen ausübt. Coughlin et al. (2008) zeigten, dass RNase P in Hefe verschiedene Box C/D *small nucleolar* RNAs (snoRNAs), die in Introns verschiedener mRNAs kodiert sind, prozessiert. Daneben wurden weitere potentielle Substrate identifiziert, die noch nicht weiter charakterisiert wurden. Neben der RNA-prozessierenden Funktion konnten auch regulierende Eigenschaften der RNase P als Transkriptionsfaktor bei der Polymerase I- bzw. III-abhängigen Transkription von rRNAs, tRNAs und anderen nichtkodierenden RNAs in Eukaryoten nachgewiesen werden (Reiner et al., 2006; Jarrous und Reiner, 2007; Reiner et al., 2008).

Neuere Studien der RNase P in *H. sapiens* und in dem niederen Eukaryoten *G. lamblia* demonstrierten die katalytische Aktivität der RNA-Untereinheit bei der Spaltung von pre-tRNA *in vitro* (Kikovska et al., 2007). Das Besondere des Versuchsaufbaus ist die Wahl eines niedrigen pH, bei dem die Spaltungsreaktion zwar langsamer abläuft, aber die Gefahr der Degradation der RNAs durch Hydrolyse verringert ist. Die RNA bildet also wie auch in der bakteriellen RNase P das katalytische Zentrum, während die Proteinuntereinheiten eine Rolle bei der Faltung und Stabilisierung der RNA übernehmen und bei der Substratbindung und Katalyse als Cofaktoren dienen.

Tab. 1: Zusammensetzung der RNase P/MRP aus Hefe, Mensch und Archaea

<i>S. cerevisiae</i>			<i>H. sapiens</i>			<i>Archaea</i>
RNase P	MW (kDa)	RNase MRP	RNase P	MW (kDa)	RNase MRP	RNase P
RPR1	120	-	H1	112	-	+
-	112	NME1	-	88	7-2	-
POP1	100,5	POP1	hPOP1	115	hPOP1	-
POP3	22,6	POP3	RPP38	38	RPP38	+
POP4	32,9	POP4	RPP29	29	RPP29	+
POP5	19,6	POP5	hPOP5	19	hPOP5	+
POP6	18,2	POP6	-	-	-	-
POP7	15,8	POP7	RPP20	20	RPP20	-
POP8	15,5	POP8	RPP14	14	-	-
RPP1	32,2	RPP1	RPP30	30	RPP30	+
RPR2	16,3	-	RPP21	21	-	+
-	22,5	SNM1	-	-	-	-
-	23,6	RMP1	-	-	-	-
-	-	-	RPP40	40	-	-
-	-	-	RPP25	25	RPP25	-

Überarbeitet nach Walker und Engelke, 2006; roter Hintergrund: RNA Untereinheiten, weißer Hintergrund: Proteinuntereinheiten; MW: ungefähre molekulare Masse, POP: processing of precursor, Rpp: RNase P Protein

1.4.1 Zusammensetzung der eukaryotischen nukleären RNase P

1.4.1.1 Die eukaryotische RNase P RNA

Die Analyse eukaryotischer RNase P beschränkte sich anfangs auf *H. sapiens* und *S. cerevisiae*. Die RNA-Untereinheit der RNase P wird durch Polymerase III transkribiert. Die Transkription der RNase P RNA des Menschen wird durch einen Typ III-Promotor reguliert. Dieser enthält die Elemente TATA-Box (-30), PSE (-60, *proximal sequence element*) und DSE (-90, *distal sequence element*) (Baer et al., 1990; Myslinski et al., 2001). Im Gegensatz zur humanen RNase P RNA wird die RPR der Hefe *S. cerevisiae* als unreifer Vorläufer transkribiert, der an beiden Enden flankierende Sequenzen enthält (Lee et al., 1991a). In Hefe wird der zweiteilige Promotor als „interner Promotor“ bestehend aus den Kontrollregionen A-Box und B-Box in einer 84 Nt langen 5'-*leader* Sequenz transkribiert, die in einem nachfolgenden Schritt von der RPR abgetrennt wird. Ein TATA-Element wurde nicht identifiziert. Am 3'-Ende enthält die Vorläufer-RPR eine ca. 30 Nt lange Sequenz, die mit U₄₋₆ endet (Lee et al., 1991a). Die erweiterte Suche in anderen eukaryotischen Reichen führte zu einem besseren Verständnis der Struktur-, Funktions- und Evolutionsbeziehungen der RNase P RNA. Die RPRs der verschiedenen Organismen zeigen signifikante Unterschiede untereinander und auch zu den eubakteriellen und archaebakteriellen Homologen (Frank et al., 2000; Marquez et al., 2005). Dennoch enthalten alle die hochkonservierten Regionen, die auch für bakterielle RNase P RNAs typisch sind.

Allen eukaryotischen RNase P RNAs ist gemeinsam, dass sie die Helices P1, P2, P3, CRI, P4, das kruziforme Element aus eP5/7, P8, P9, P10/11, die konservierten CRII und CRIII, P12, CRIV und CRV sowie eine Reihe hochkonservierter Nukleotide enthalten (Marquez et al., 2005; Abb. 9). Eukaryotische RNase P RNA besitzt in den meisten Fällen keine P15-Domäne, die in den Eubakterien die Substratbindung an das 3'-CCA ermöglicht. Obwohl einige eukaryotische Spezies eine Helixstruktur vor der CRIV besitzen, die als eP15 bezeichnet wird, hat diese keinerlei Sequenzähnlichkeit zur bakteriellen P15-Domäne. Die adeninreiche Ausbuchtung (ungepaarte Region) zwischen P10 und P11 in der Spezifitätsdomäne fehlt ebenfalls (Kirsebom, 2007). Die Ergebnisse aus phylogenetischen Analysen und Crosslinkstudien zeigten, dass die bakteriellen und die eukaryotischen RNase P RNAs eine ähnliche Konsensusstruktur enthalten (Frank et al., 2000; Marquez, et al., 2006; Kirsebom 2007). Das Fehlen der Helices P5 und P6 in eukaryotischen RPRs führt zu einer Instabilität zwischen der C- und S-Domäne (Frank et al., 2000). Die Deletion von drei Nukleotiden in der Helix P4 (H1_{Δ80-82}) beseitigt die schwache katalytische Aktivität der humanen RPR

vollkommen. Eine Deletion der J5/7/8 in *G. lamblia* führte ebenfalls zum vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität. Die schwache Aktivität und Bindungskonstante der eukaryotischen RNase P RNA ist vergleichbar mit der einer bakteriellen RNA, die eine Deletion der gesamten Region P15-P17 enthält (Kikovska et al., 2007). Daher ist es vorstellbar, dass die eukaryotischen RNase P Proteine bei der Bindung und Katalyse assistieren, indem sie die Funktionen übernehmen, die in den fehlenden RNA-Strukturelementen liegen.

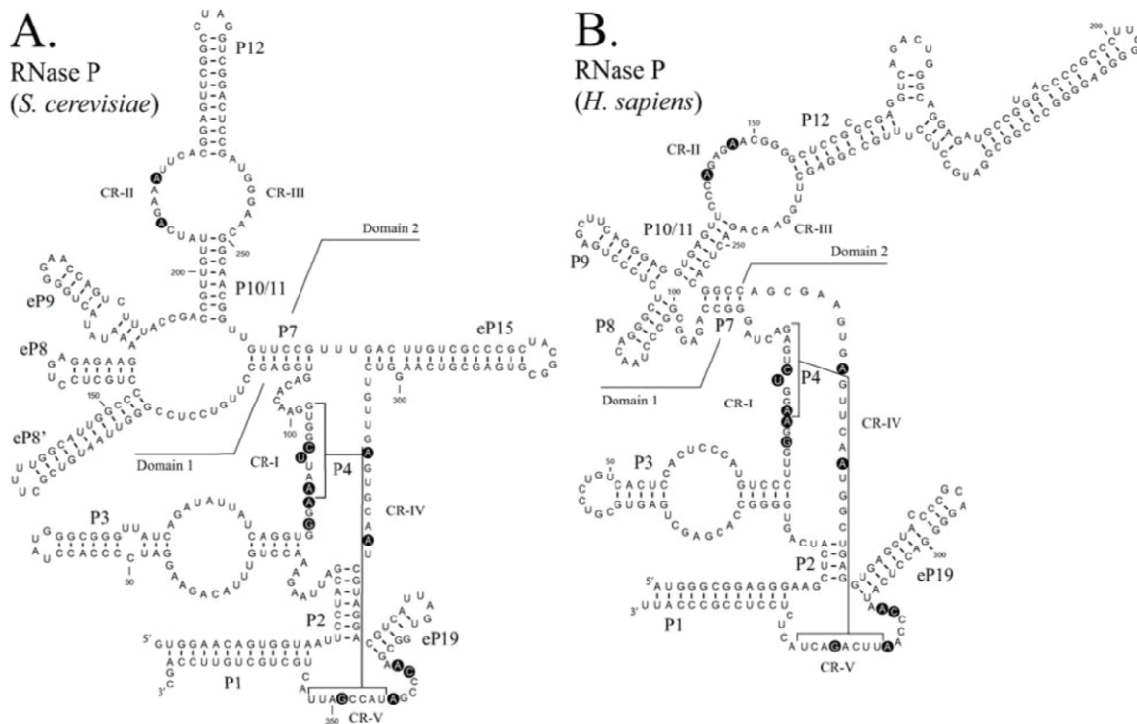


Abb. 9: Beispiele von Sekundärstrukturen eukaryotischer nukleärer RNase P RNAs

Die RNase P RNAs von *Saccharomyces cerevisiae* (A) und *Homo sapiens* (B) lassen sich wie die bakteriellen RNase P RNAs in zwei Domänen teilen: C-Domäne (Domain 1) und S-Domäne (Domain 2). In allen RNase P RNAs konservierte Nukleotide sind durch dunkle Kreise markiert (Walker und Engelke, 2006; vgl. MRP RNAs in Abb. 11).

Mutationen in den Helices eP8 und eP9 beispielsweise zeigten einen nicht-letalen Defekt in der Holoenzymbildung, Lokalisierung und pre-tRNA-Spaltung (Xiao et al., 2005). Die Helices eP8 und eP9 scheinen *in vivo* bei der Assoziation der RNase P Proteine mit der pre-RPR eine große Rolle zu spielen, während die Schleifenregion J4/7 bei der Bindung an die reife RPR wichtig ist. Footprint-Analysen, in denen gezeigt wurde, dass J4/7 wie auch der terminale Tetraloop von eP9 im Holoenzym geschützt ist, bestätigen diese Beobachtungen (Tranguch et al., 1994). Wie auch in Bakterien ist die Region P9/10/11 in die Bindung des

pre-tRNA-Substrates involviert (Mann et al., 2003; Krasilnikov et al., 2003 und 2004; Xiao et al., 2005).

1.4.1.2 Eukaryotische RNase P Proteine

Die eukaryotische RNase P setzt sich in *H. sapiens* aus der H1-RNA und den Proteinen hPOP1, hPOP3/Rpp38, hPOP4/Rpp29, hPOP5, hPOP7/Rpp20, Rpp1/Rpp30, RPR2/Rpp21, Rpp40, Rpp25 und Rpp14 zusammen. Die Hefe-RNase P enthält die RNase P RNA Rpr1 und die Proteine POP1, POP3, POP4, POP5, POP6, POP7, POP8, Rpp1 und Rpr2 (Tab. 1; Walker und Engelke, 2006). Die Interaktionen der Proteinuntereinheiten von Hefe und Mensch wurden in *yeast-two-hybrid* (Hefe-Proteine: Houser-Scott et al., 2002; humane Proteine: Jiang et al., 2001) und *GST-pulldown* Analysen studiert (Hefe-Proteine: Aspinall et al., 2007; humane Proteine: Welting et al., 2004).

Das Zentrum des Enzyms wird von den Proteinen POP1p, POP4p/Rpp29p und Rpp1p/Rpp30p gebildet, da sie die meisten Interaktionen zu anderen Proteinuntereinheiten und auch zur RPR ausbilden (Aspinall et al., 2007). Die Untereinheiten POP6p und POP8p sind wegen ihrer geringen und schwachen Bindungscharakteristik in der Peripherie anzusiedeln. Neben zahlreichen intermolekularen Bindungen kommt es bei einigen Proteinen (POP1, POP3, POP4, POP5, POP7, Rpp1) auch zu Selbstassoziationen (Houser-Scott et al., 2002; Jiang et al., 2001; Aspinall et al., 2007; Welting et al., 2004; Boomersshine et al., 2003). Vermutlich sind diese Proteine in mehr als einer Kopie im Holoenzym vorhanden.

Neben ihrer unterschiedlichen Stöchiometrie haben die Proteinuntereinheiten auch verschiedene Funktionen und Eigenschaften. Die RNA-Bindungsfähigkeit einiger Proteine könnte durch eine RNA-Chaperonfunktion zur Strukturstabilisierung beitragen. Auch bei der Substratauswahl könnten die Proteine beteiligt sein, da beispielsweise die in Bakterien wichtige 3'-CCA-Interaktion von J16-15 fehlt. Weitere Funktionen sind die Beteiligung an der Reifung der RPR, die Lokalisation des Holoenzym und die Assemblierung des Komplexes im Nukleus.

1.4.2 Spezielle Funktion der eukaryotischen RNase P Proteine

Da auch eukaryotische RNase P RNAs unter bestimmten Bedingungen katalytisch aktiv sind und die pre-tRNA mit gleicher Spezifität spalten wie bakterielle RNase P RNA, kann angenommen werden, dass die Proteine nur eine unterstützende Funktion bei der Substraterkennung und Katalyse, sowie bei der Faltung der RNA ausüben (Kikovska et al. 2007; Perederina et al., 2010; Takagi et al., 2004). Die Beteiligung der Proteine im Komplex

dient vermutlich dem Ausgleich der fehlenden stabilisierenden Strukturen der eukaryotischen RNase P RNA. So wurden für die Proteinuntereinheiten der RNase P neben Protein-Protein-Interaktionen (Abb. 10) direkte RNA-Bindungseigenschaften sowohl mit den RNase P/MRP RNAs als auch mit den Substraten nachgewiesen (Tab. 2). Die Assoziation vieler mRNAs und nichtkodierender RNAs mit dem RNase P Holoenzym wird auf die durch die eukaryotischen RNase P Proteine erweiterte Substratspezifität zurückgeführt (Coughlin et al., 2008; Marvin und Engelke, 2009).

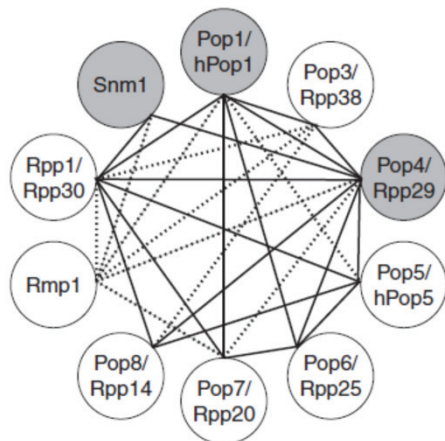


Abb. 10: Übersicht der Protein-Protein-Interaktionen der RNase P/MRP Proteine in Hefe und Mensch

Die RNase P/MRP Proteine üben vielfältige Interaktionen mit den anderen Proteinuntereinheiten aus, die durch *yeast-two-hybrid* und *GST-pulldown* nachgewiesen wurden. Durchgezogene Linien repräsentieren direkte Interaktionen, die in der Mehrzahl der Studien verifiziert wurden, gestrichelte Linien repräsentieren weniger häufige Protein-Interaktionen. Die Proteine in grauen Kreisen neigen zur Selbstassoziation (Aspinall et al., 2007). Die Proteine Snm1 und Rmp1 sind Untereinheiten der RNase MRP in Hefe.

Rpp29p/POP4p interagiert mit der RNase P RNA und dient vermutlich als Grundgerüst für die Assemblierung der RNase P Proteine an die RNA (Jiang et al., 2001; Houser-Scott et al., 2002; Numata et al., 2004). Rpp29p und Rpp21p zusammen können mit der H1-RNA RNase P-Aktivität ausbilden (Mann et al., 2003). Als einziges der Proteinuntereinheiten der humanen RNase P ist Rpp29 in der Lage, das bakterielle C5-Protein teilweise zu ersetzen und einen stabilen aktiven Komplex mit der M1-RNA zu bilden (Mann et al., 2003; Sharin et al., 2005).

POP1p bindet sowohl RPR als auch MRPR (Ziehler et al., 2001; Welting et al., 2004). Das Protein spielt in Hefe bei der Reifung der RPR eine wichtige Rolle, übt eine stabilisierende Wirkung auf RPR und MRPR aus und hat Einfluss auf die Funktion der beiden Enzyme (Lygerou et al., 1994). Beide Funktionen scheinen unabhängig voneinander zu existieren, also in verschiedenen Domänen bzw. Sequenzabschnitten vorhanden zu sein (Xiao et al., 2006). Eine Bindung des hPOP1-Proteins an pre-tRNAs wurde von True und Celander (1998) durch Foto-crosslinks gezeigt. Für das Protein in Hefe konnte diese Eigenschaft nicht gezeigt werden, sie wird aber vermutet (Xiao et al., 2006).

Das POP3p-Homologe Rpp38p interagiert sowohl mit RPR als auch MRPR (Welting et al., 2004) und scheint einen regulatorischen Einfluss auf die Transkription von Rpp29, Rpp21 und Rpp25 zu nehmen. Wird humane Rpp38-mRNA zerstört, senkt das die mRNA- und

Protein-Level der anderen drei Rpps. Auch die Lokalisierung der Untereinheiten Rpp21p und Rpp25p wird von Rpp38p beeinflusst (Kovrigina et al., 2003). Eine Senkung der zellulären Rpp38-mRNA-Menge verhindert den Transport der beiden Proteine in den Nukleus. Dieser Effekt wurde allerdings auch bei Rpp21, 25 und 29 bemerkt, deren Inhibition die Proteinmengen von Rpp21, 25, 29, 30 und 38 senkte (Zhang und Altman, 2004). Der Mechanismus konnte noch nicht geklärt werden. Die Mengen der RPR bzw. MRPR blieben davon unberührt. In Hefe wurde die Bindung von POP3p an pre-tRNA nachgewiesen, nicht aber an reife tRNAs (Brusca et al., 2001). Dabei wurde der C-Terminus als RNA-Bindungsregion identifiziert.

Tab. 2: RNA-Bindungspartner der RNase P Proteine

RNase P Protein	RNA Bindungspartner	Referenzen
POP1	RPR; MRPR*; bindet P3 [#]	Srisawat et al., 2002(y); [#] Ziehler et al., 2001 (y); Jiang et al., 2001(h); * Welting et al., 2004(h); * Aspinall et al., 2007(y)
POP3/Rpp38	RPR; MRPR*; pre-tRNA [#]	Jiang et al., 2001(h); * Aspinall et al., 2007(y); [#] Brusca et al., 2001(y)
POP4/Rpp29	RPR; pre-tRNA; tRNA [#] ; MRPR*; pre-rRNA*; M1-RNA [#]	Houser-Scott et al., 2002(y); Chu et al., 1997; [#] Sharin et al., 2005; * Aspinall et al., 2007(y); * Welting et al., 2004(h); [#] Mann et al., 2003(h)
POP6/Rpp25	RPR; bindet P3 auch als Heterodimer mit POP7 [#] ; MRPR*; pre-rRNA*	Jiang et al., 2001(h); [#] Perederina et al., 2007(y); * Aspinall et al., 2007(y); * [#] Welting et al., 2007(h)
Rpp40	RPR	Jiang et al., 2001(h)
POP7/Rpp20	bindet P3 der RPR nur als Heterodimer mit POP6/Rpp25 [#] ; MRP*	Welting et al., 2007(h); [#] Perederina et al., 2007(y); * Welting et al., 2004(h); * Aspinall et al., 2007(y)
POP5	keine Bindung	Houser-Scott et al., 2002(y); Aspinall et al., 2007(y); Welting et al., 2004(h); Jiang et al., 2001(h)
Rpp1/Rpp30	RPR; MRPR	Welting et al., 2006(h)
POP8/Rpp14	pre-tRNA	Jarrous und Altman 2001(h)
Rpr2/Rpp21	pre-tRNA; tRNA; RPR; MRP*	Jarrous et al., 2001(h); * Welting et al., 2004(h)

Die Bindungseigenschaften wurden durch *yeast-two-hybrid* bzw. *GST-pulldown* mit den RNase P-Komponenten aus *S. cerevisiae* (y) bzw. *H. sapiens* (h) untersucht. *, [#] geben das jeweilige Zitat an.

Das humane POP7p-Homologe Rpp20p besitzt eine ATPase-Aktivität, deren Funktion noch unklar ist, da für die RNase P-Aktivität keine ATP-Hydrolyse erforderlich ist (Li und Altman, 2001). Helikase-Aktivität konnte für Rpp20p nicht nachgewiesen werden. Eine Funktion bei der Holoenzymassemblierung wird vermutet. Durch *yeast-two-hybrid* und Co-Immuno-präzipitation wurden Interaktionen von Rpp20p mit Hsp29p, Hsp27p, KIAA0065p und SMNp nachgewiesen (Jiang und Altman 2001; Hua und Zhou 2004). Wie Rpp25p dissoziiert es leicht vom MRP-Komplex (60-80S-Partikel). Rpp20p hat keine nachweisbaren direkten Bindungen mit der RNase P RNA, aber mit der RNase MRP RNA (Jiang et al., 2001; Welting et al., 2004; Hands-Taylor et al., 2010). Für POP7p in Hefe konnte ebenfalls eine Bindung an RNase MRP RNA nachgewiesen werden, die von geringer Spezifität ist (Aspinall et al., 2007).

Rpp25p bindet RNase P RNA und funktioniert als stabilisierender Faktor für die Interaktion zwischen Rpp20p und der Helix P3 der RNase MRP RNA (van Eenennaam et al., 2002; Welting et al., 2004 und 2006). Sowohl mit dem humanen Protein als auch mit dem Homologen in Hefe wurde gezeigt, dass es als Dimer mit Rpp20/POP7 an die RNase P- und MRP RNA bindet (Perederina et al., 2007; Welting et al., 2007; Hands-Taylor et al., 2010; Reiner et al., 2011).

Sowohl Rpp20p als auch Rpp25p haben eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den Proteinen der Alba-Familie (Aravind et al., 2003). Alba ist ein chromosomales Protein, das in den Crenarchaea vorkommt und die Organisation der Chromosomen ähnlich den eukaryotischen Histonen vornimmt (Sandman und Reeve, 2000). In anderen Archaea und Eukaryoten konnten homologe Sequenzen identifiziert werden, deren genaue Funktionen aber noch weitestgehend unbekannt sind (Hands-Taylor et al., 2010).

Bei Rpp14p wurde eine genetische Verknüpfung mit dem Fettsäuresyntheseweg II in den Mitochondrien entdeckt. Ein zweiter ORF am 3'-Ende der mRNA kodiert für eine 3-Hydroxyacyl-Thioester Dehydratase (Autio et al., 2008), die in Mitochondrien lokalisiert ist. Die Konservierung dieses genetischen Arrangements in anderen Organismen zeugt von einer 400 Mio. Jahre alten Verknüpfung von RNA-Metabolismus und der mitochondrialen Fettsäuresynthese. Außerdem konnte eine 3'→5'-Exoribonukleaseaktivität bei Rpp14p nachgewiesen werden, die Rpp14p als Teil des Exosoms vermuten lässt (Jiang und Altman, 2002).

Für POP5p konnte eine Interaktion mit der H1-RNA gezeigt werden (Reiner et al., 2011).

Die Eigenschaften und Funktionen der anderen RNase P/MRP Proteine (Rpp40, und Rpp30) sind bisher noch wenig charakterisiert.

1.4.3 Lokalisation der RNase P und ihrer Untereinheiten

In Hefe, Mensch und Ratte wurde durch *in situ* Hybridisierung und Fluoreszenzmarkierungen die Lokalisierung der RNase P im Nukleoplasma und teilweise in den Nukleoli gezeigt. Das deutet auf eine enge Beziehung zur pre-rRNA- und pre-tRNA-Synthese hin, die in diesen Kompartimenten des Kerns stattfinden (Bertrand et al., 1998; Jacobson et al., 1997; Lee et al., 1996). Da die pre-tRNA nicht im Nukleolus vorhanden ist, scheint die anfängliche Akkumulation injizierter RPR im Nukleolus einem Reifungsschritt der RNase P zu entsprechen. Die für die nukleoläre Lokalisierung verantwortliche Struktur in der humanen RPR ist in den Nukleotiden 1-70 (P3) zu finden, die mit den Proteinen hPOP1p, Rpp38p, Rpp25p, Rpp20p und Rpp40p interagiert. Neben den nukleären wurden in Säugerzellen auch cytoplasmatische und teilweise mitochondriale Signale der RPR nachgewiesen (Lee et al., 1996). Letztere wurden ursprünglich einer möglichen mitochondrialen RNase P RNA (mtRNase P RNA) zugeordnet, die cytoplasmatischen als Artefakt der Präparation. Da inzwischen gezeigt wurde, dass mtRNase P ein reines Proteinenzym ist (Holzmann et al., 2008), könnten diese Signale ebenfalls Artefakte sein. Interessanterweise sind nicht alle RNase P Proteine zusammen mit der RPR im Nukleolus lokalisiert. So befindet sich Rpp21p nur im Nukleoplasma (Jarrous et al., 2001), während Rpp14p (keine Kernlokalisierungssequenz), hPOP1p, Rpp29p, Rpp38p, Rpp20p und Rpp25p in den Nukleoli nachweisbar sind (Lygerou et al., 1996; Jarrous et al., 1999; van Eenennaam et al., 2001 a/b; Welting et al., 2006). Eine Besonderheit tritt bei Rpp29p auf, das zwischen Nukleolus und Nukleoplasma wandert (Chen und Huang, 2001).

1.4.4 Die nukleäre RNase P in Pflanzen

Pflanzen enthalten neben Nukleus und Mitochondrien als weitere genetisch kompetente Kompartimente die Chloroplasten. Da beide Organellen den größten Teil ihrer genetischen Information in den Kern transferiert haben, sind sie auf den Import von RNA und Proteinen angewiesen. RNase P-Aktivitäten konnten in Pflanzen nachgewiesen und partiell aufgereinigt werden (Arends und Schön, 1997; Franklin et al., 1995). Der Nachweis einer RNA-Untereinheit nukleärer RNase P in Pflanzen konnte bisher nicht erbracht werden, obwohl es Hinweise auf deren Existenz gibt. So weist die Schwebbedichte gereinigter Weizen-RNase P im CsCl-Gradienten mit 1,34 g/ml auf eine RNA-Komponente hin, da die meisten zellulären Proteine eine geringere Dichte besitzen (Arends und Schön, 1997). Die Nukleasesensitivität der RNase P-Aktivität in Karotten und Weizen unterstützt die These einer RNA-abhängigen RNase P in Pflanzen (Franklin et al., 1995; Schön, 1996).

In *A. thaliana* und *N. tabacum* wurde bisher keine RNase P RNA jedoch eine RNase MRP RNA identifiziert (Kiss et al., 1992). Eine zweite als RNase MRP RNA deklarierte Variante konnte in *A. thaliana* durch Piccinelli et al. (2005) *in silico* identifiziert werden.

1.5 RNase P in Organellen

In Übereinstimmung mit der Endosymbiontentheorie verfügen die Mitochondrien und Chloroplasten, die ihren Ursprung in freilebenden Bakterien haben, über ein eigenes Genom (Gray, 1989). Im Zuge der Evolution wurde jedoch ein Großteil der ursprünglichen genetischen Information an den Zellkern abgegeben. Neben einer Reduzierung der Größe des Organellengenoms führte diese Entwicklung zur Notwendigkeit des Imports kernkodierter Proteine und in Einzelfällen auch RNAs (Lang et al., 1997; Entelis et al., 1998; Race et al., 1999; Salinas et al., 2008) in die Organellen. Die Betrachtung der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen bestimmten Bakterien und Organellen, insbesondere der Vergleich ihrer jeweiligen RNase P, ist deshalb in besonderem Maße geeignet, Einblicke in die Evolution eines ursprünglichen RNA-Enzyms zu geben. Die mögliche Verteilung der Gene für die verschiedenen Untereinheiten eines Holoenzym auf die Zellkompartimente erschwert diesen Ansatz.

1.5.1 Mitochondriale RNase P

Mitochondriale RNase P wurde, wenn auch mit großen Unterschieden in der Ausführlichkeit, für Pflanzen, Vertebraten, Hefen und parasitäre Protozoa charakterisiert (Frank und Pace, 1998; Salavati et al., 2001). Genetische Analysen in Hefe zeigten schon sehr früh, dass sich diese RNase P-Aktivität aus kernkodierten und mitochondrial kodierten Untereinheiten zusammensetzt (Martin und Underbrink-Lyon 1981; Hollingsworth und Martin 1986). Rossmann et al. (1995) zeigten, dass mitochondriale pre-tRNA^{Tyr} nicht durch nukleäre RNase P prozessiert wird. Dies bestätigte die Annahmen, dass es in weiteren Eukaryoten zwei Enzyme für die 5'-Prozessierung von pre-tRNAs geben muss (Karwan, 1993).

1.5.1.1 Die mitochondriale RNase P in Hefe

Die Zusammensetzung und Struktur der mitochondrialen RNase P aus *Saccharomyces cerevisiae* unterscheidet sich stark von der humanen mtRNase P. Das mitochondriale RNase P-Holoenzym in *S. cerevisiae* besteht aus einer im mitochondrialen Genom kodierten essentiellen RNA-Untereinheit, Rpm1r (490 Nt), und der kernkodierten Protein-Untereinheit Rpm2p von 105 kDa (Miller und Martin, 1983; Underbrink-Lyon et al., 1983; Hollingsworth und Martin, 1986; Morales et al., 1989; Morales et al., 1992; Dang und Martin, 1993).

Die Rpm1r-Untereinheit zeichnet sich trotz ihres hohen Anteils an A-U-Basenpaaren durch zwei in allen RNase P RNAs konservierte Bereiche aus und lässt sich in der typischen Sekundärstruktur darstellen. Wie bei RNase P aus Cyanellen, hat eine Degradierung der RNA, etwa während einer Holoenzym-Präparation, keinen Einfluss auf die Prozessierungsaktivität. Katalyse und Substratbindung scheinen deshalb hauptsächlich Aufgabe der Protein-Untereinheit zu sein (Morales et al., 1989). Auch in anderen Pilzen konnten Homologe zu Rpm1r identifiziert werden, die in ihrer Größe (140-490 Nt) zum Teil erhebliche Unterschiede aufweisen (Shu et al., 1991; Wise und Martin, 1991; Stribinskis et al., 1996). Bei der Charakterisierung mitochondrialer RNase P aus Kartoffeln konnte ein assoziiertes RNA-Fragment identifiziert werden. Die Funktion dieser RNA und das sie kodierende Gen sind unbekannt (Marchfelder und Brennicke, 1994).

Die Protein-Untereinheit Rpm2p ist für die mitochondriale RNase P-Aktivität in *S. cerevisiae* essentiell. Dieses Protein zeigt keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten zu den nukleären oder bakteriellen RNase P Proteinen. Mutationen im Rpm2p-Gen führen zu einer Anreicherung von mitochondrialen pre-tRNAs, die am 5'-Ende nicht prozessiert wurden (Morales et al., 1992). Zusätzlich zur pre-tRNA-Reifung spielt Rpm2p bei der Prozessierung der mitochondrialen RNase P RNA eine entscheidende Rolle (Stribinskis et al., 1996; Stribinskis et al., 2001 a/b). Neben diesen Funktionen agiert das Protein im Kern als Transkriptionsaktivator verschiedener mitochondrialer Proteine des Importapparates und einiger Chaperone (Kassenbrock et al., 1995; Stribinskis et al., 2005). Im Cytosol beeinflusst es die Lagerung und den Abbau von mRNAs in *P-bodies* (Stribinskis und Ramos 2007). Durch Co-Immunoprecipitation kann in Hefe mit Antikörpern gegen Rpm2p die mitochondriale RNase P RNA spezifisch präzipitiert werden (Dang und Martin, 1993).

1.5.1.2 Die humane mitochondriale RNase P

Anders als in *S. cerevisiae* konnte in Mitochondrien von *H. sapiens* keine RNase P RNA identifiziert werden. Die proteinähnliche Dichte in Cs₂SO₄ Gradienten (1,23 g/ml) und die Nukleaseresistenz der humanen mitochondrialen RNase P (Micrococcus-Nuklease und RNase A) bestärken diese Vermutung (Rossmanith und Karwan, 1998). Holzmann et al. (2008) konnten aus mitochondrialer RNase P drei Proteine (MRPP1, 2, 3) isolieren und die Aktivität durch Rekonstitutionsversuche mit den rekombinanten Proteinen herstellen; hierbei wird keine RNase P RNA benötigt. Für die Proteine wurden drei verschiedene Aktivitäten bestimmt: eine tRNA-Methyltransferase, eine Dehydrogenase/Reduktase und eine Metallonuklease. Funktionell unterscheidet sich die mitochondriale RNase P der Eukaryoten

nicht von der nukleären Variante. Sie generiert ein 5'-Phosphat in der tRNA, ist abhängig von zweiwertigen Ionen und unabhängig von ATP und Cofaktoren.

1.5.2 RNase P in Plastiden

In Analogie zur Diskussion einer RNase P RNA-Untereinheit im humanen mitochondrialen System war die Zusammensetzung der RNase P aus Chloroplasten höherer Pflanzen lange unklar. Die Untersuchungen der RNase P-Aktivität aus isolierten Chloroplasten von Spinat und Tabak (Wang et al., 1988; Thomas et al., 1995; Gegenheimer, 1996) deuteten darauf hin, dass die RNase P aus den Chloroplasten des Spinats ausschließlich aus Proteinen besteht: Die CsCl-Schwebedichte des Enzyms (1,28 g/ml) stimmt mit der von Proteinen überein; Die RNase P-Aktivität ist gegenüber Hydrolyse mit *Micrococcus*-Nuklease inert; Der Mechanismus der 5'-tRNA-Prozessierung unterscheidet sich von dem der bakteriellen RNase P-Ribozyme. Thomas et al. (2000) konnten zeigen, dass durch den Austausch eines Sauerstoff-Atoms gegen Schwefel in der pro-R_p-Position des Übergangszustandes die RNase P-Aktivität im Gegensatz zu der aus Bakterien (Warnecke et al., 1996; Chen et al., 1997) kaum herabgesetzt wird. Für den Spaltungsmechanismus bakterieller RNase P ist dieses Sauerstoffatom über die Koordination von Mg²⁺-Ionen in direkter räumlicher Nähe zum katalytischen Zentrum der RNase P RNA von essentieller Bedeutung. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Gegenheimer lassen deshalb den Schluss zu, dass die Katalysereaktion der RNase P aus Spinat-Chloroplasten einem anderen Mechanismus folgt und unabhängig von einer RNA-Komponente durchgeführt wird (Thomas et al., 2000). Erst nach der Entdeckung, dass humane mitochondriale RNase P nur aus drei Proteinuntereinheiten zusammengesetzt ist (Holzmann et al., 2008), konnten drei pflanzliche Homologe zu MRPP3 identifiziert und untersucht werden (PRORP1, 2 und 3; Gobert et al., 2010). Während PRORP 1 in den Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiert ist, konnten PRORP 2 und 3 nur in den Nuklei nachgewiesen werden. Für die RNase P-Aktivität in Mitochondrien und Chloroplasten ist allein PRORP1 essentiell.

Die Cyanellen der eukaryotischen Alge *Cyanophora paradoxa* nehmen eine Zwischenstellung in der Evolution zwischen Chloroplasten und Cyanobakterien ein. Das Genom der Cyanelle ist in der Organisation zwar dem der Chloroplasten ähnlich, doch besitzt das Cyanellen-Genom einige Gene, die im Chromosom der Cyanobakterien, nicht aber in Chloroplasten-Genomen höherer Pflanzen gefunden werden können. Baum und Schön (1996) konnten für die Cyanellen von *C. paradoxa* die erste RNA-Untereinheit einer RNase P aus fotosynthetischen Organellen nachweisen. Diese RNA ist im Cyanellen-Genom kodiert (Baum et al., 1996, Baum und Schön 1996). Sowohl die Sequenz als auch die postulierte A-Typ Struktur

der RNA zeigt große Homologien zu cyanobakteriellen RNase P RNAs (Cordier und Schön, 1999).

Das Molekulargewicht des *C. paradoxa*-Holoenzym wurde durch Ultrazentrifugation im Glyceringradienten zu etwa 280 kDa bestimmt (Heubeck und Schön, 2001; Heubeck, 2003). RNase P-Aktivität und RNase P RNA-Untereinheit korrelieren im Gradienten mit einem 30 kDa-Protein, welches im Immunoblot mit Antikörpern, die spezifisch für cyanobakterielles RNase P Protein sind, nachgewiesen wurde. Während der Holoenzym-Präparation kommt es zu einer Degradierung der RNA, ohne dass die Prozessierungsaktivität beeinträchtigt wird (Baum et al., 1996; Cordier und Schön, 1999). Das Cyanellen-Holoenzym zeigt aber in wesentlichen Merkmalen eine Übereinstimmung mit eukaryotischer und nicht mit bakterieller RNase P (Cordier und Schön, 1999; Heubeck, 2003).

Neben RNase P aus den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa* und der verwandten *Glaucocystis nostochinearum* (Schön, nicht veröffentlicht) konnten in der Zwischenzeit RNase P RNA-Gene in den Plastomen der Rotalge *Porphyra purpurea* (Reith und Munholland, 1995), der Grünalge *Nephroselmis olivacea* (Turmel et al., 1999) und weiteren primitiven Algen (Schön, unveröffentlicht) identifiziert werden. Nur für die RNase P RNA der Cyanelle aus *Cyanophora paradoxa* konnte die RNase P-Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden (Li et al., 2007). In den Plastomen höherer Pflanzen können hingegen keine Sequenzhomologien zu RNase P RNAs gefunden werden. Für das Chloroplastengenom aus Mais wird als einzige höhere Pflanze eine mögliche RNase P RNA Sequenz kontrovers diskutiert (Collins et al., 2000; de la Cruz und Vioque, 2003).

1.6 RNase MRP

Die RNase MRP ist die für Eukaryoten spezifische Endoribonuklease, welche in Maus die RNA-Primer für die mitochondriale DNA-Replikation bereitstellt (Chang und Clayton, 1987 und 1989; Gold et al., 1989). Außerdem ist sie in Hefe und Mensch an der Reifung von 5,8S rRNA (Lygerou et al., 1996; Thiel et al., 2005) und am Abbau der CL2B-mRNA (Gill et al., 2004) beteiligt. So ist sie möglicherweise an der Zellzykluskontrolle und Chromosomensegregation beteiligt (Cai et al., 1999). Die menschliche RNase MRP hat neben der Regulation der B-Cycline auch beim Zusammenbau der Ribosomen eine regulierende Funktion. Verschiedene Mutationen im Gen der humanen RNase MRP RNA führen daher beim Menschen zu schweren Wachstumsbehinderungen (Thiel et al., 2005).

1.6.1 RNase MRP RNA

Die menschliche MRP RNA konnte außer in den Nukleoli auch im Cytosol (Jacobson et al., 1995; Gill et al., 2006), aber nicht in den Mitochondrien nachgewiesen werden (Kiss und Filipowicz, 1992). Die Analyse neuer RNase MRP RNA-Sequenzen zeigte Homologien in eP15 (ymP8) und eP19 in der katalytischen Domäne, sowie in P8, P9 und P10/11 in der Strukturdomäne (Piccinelli et al., 2005). Das GARAR-Motiv ist in den meisten Spezies vorhanden und definiert einen Pentaloop am Ende von P8. Dieses Motiv kann in einzelnen phylogenetischen Gruppen als Tetraloop (GARA) auftreten und ist ein charakteristisches Merkmal der RNase MRP RNA (Abb. 11).

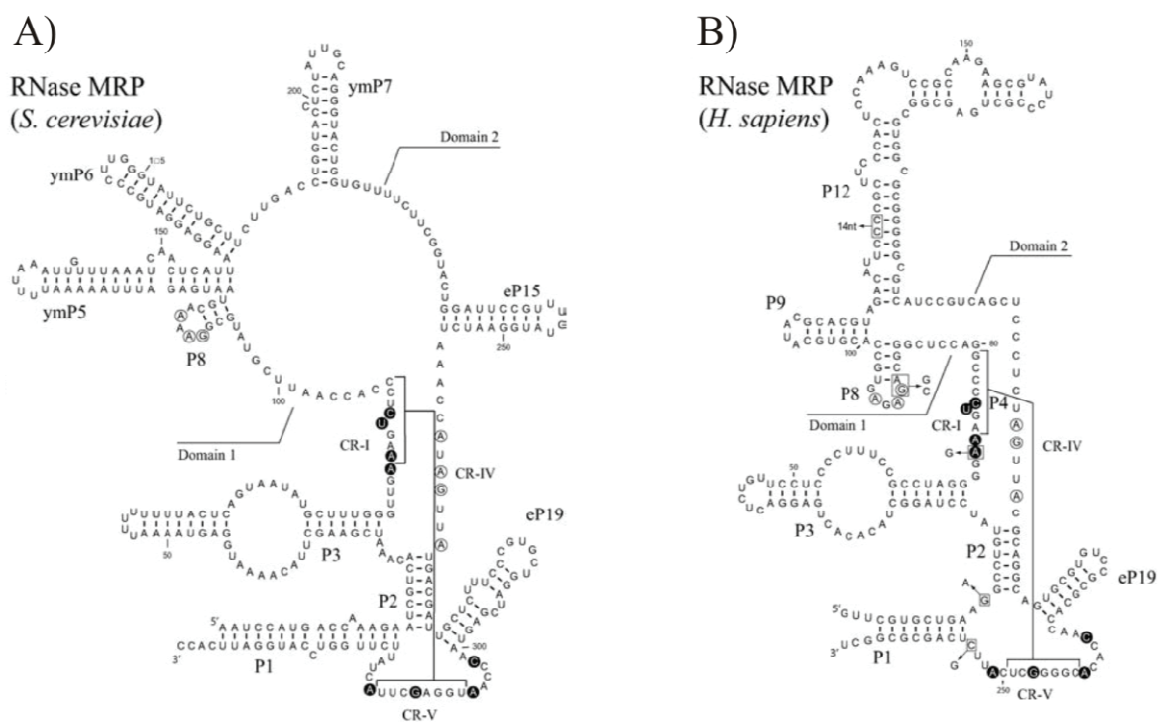


Abb. 11: Beispiele von Sekundärstrukturen eukaryotischer nukleärer RNase MRP RNAs

Die RNase MRP RNAs von *Saccharomyces cerevisiae* (A) und *Homo sapiens* (B) lassen sich wie die RNase P RNAs in zwei Domänen teilen: C-Domäne (Domain 1) und S-Domäne (Domain 2). In allen RNase MRP RNAs konservierte Nukleotide sind durch dunkle Kreise markiert (Walker und Engelke, 2006; vgl. RNase P RNAs in Abb. 9)

Aufgrund der Homologien und der strukturellen Konservierung wird vermutet, dass MRP RNA und RNase P RNA sich aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben (Li et al., 2002). Die hohen Sequenzidentitäten zwischen den RNase P- und MRP RNAs aus *Dictyostelium discoideum* und aus *Encephalitozoon cuniculi* stehen im Widerspruch zu der Annahme, dass sich beide unabhängig voneinander entwickelt haben könnten (Zhu et al., 2006). Die RNA-Untereinheit der RNase MRP wird wie die RNase P RNAs durch die

Polymerase III transkribiert. Die tierischen und pflanzlichen Promotoren enthalten immer eine TATA-Box und ein nahes stromaufwärtsgelegenes Element (PSE/USE; *proximal/upstream sequence element*) sowie in einigen Fällen ein weiter entferntes Sequenzelement (DSE; *distal sequence element*) (Woodhams et al., 2007). Die Anordnung der Promotorelemente entscheidet über Spezifität und Stärke der Promotoren.

Die ersten RNase MRP RNA-ähnlichen Sequenzen in Pflanzen wurden von Kiss et al. (1992) in *A. thaliana* und *N. tabacum* identifiziert. In beiden Arten werden die RNAs ebenfalls durch die Polymerase III transkribiert. Der Promotor enthält die konservierten USE- und TATA-Elemente. Die RNAs haben eine hohe Sequenzähnlichkeit in den konservierten Regionen und lassen sich in die typische RNase MRP RNA-Struktur einpassen (Kiss et al., 1992; Piccinelli et al., 2005). Die Sekundärstrukturelemente P1, P2, P3, P4 und eP19 der C-Domäne sind vorhanden, wie durch Sequenzvergleiche bestätigt wurde. Auch konservierte Teile der S-Domäne wie die Helices P8, P9, P12 sind in den pflanzlichen RNA-Sequenzen konserviert (Piccinelli et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass sie wie die RNase MRP RNAs anderer Organismen in den Nukleoli angereichert sind (Kiss et al., 1992).

1.6.2 RNase MRP Proteine

Während für RNase P in *S. cerevisiae* bisher neun assoziierte Proteine bekannt sind, so konnten bei der RNase MRP zehn Proteinuntereinheiten nachgewiesen werden (Salinas et al., 2005), wovon acht identisch mit denen der RNase P sind (Chamberlain et al., 1998). Die beiden Proteinuntereinheiten Snm1p (Schmitt und Clayton 1994) und Rmp1p sind nur in Hefe mit dem RNase MRP-Komplex assoziiert (Tab. 1; Aspinall et al., 2007). Die Untereinheit Rmp1p interagiert nur mit wenigen Untereinheiten des Enzymkerns, aber mit der MRP RNA und mit Snm1p. Da beide Untereinheiten sowohl MRP RNA als auch pre-rRNA binden, liegt es nahe, dass diese beiden Proteine in enger Verbindung an der Ausbildung der Enzymfunktion, also Substratbindung und/oder -Spaltung beteiligt sind. Snm1p ist aufgrund seiner Primärsequenz mit Rpp21 nah verwandt. Jedoch zeigen diese beiden Proteine unterschiedliche Interaktionen mit den anderen Proteinen. Im RNase MRP-Holoenzym des Menschen wurden keine zusätzlichen Proteine identifiziert; hier enthält die RNase P zusätzlich die Proteine Rpp21 und Rpp40 (Jarrous et al., 1998; Jarrous et al., 2001).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Für RNase P und RNase MRP aus Pflanzen existieren bisher nur wenige Untersuchungen. Trotz der Aufreinigung über mehrere chromatografische Schritte und Hinweisen auf eine Nukleinsäurekomponente konnte ihre Zusammensetzung bisher nicht geklärt werden. Obwohl der Aktivitätsnachweis für RNase P gezeigt werden konnte, fehlte bisher die Analyse ihrer Zusammensetzung. Auch der Nachweis einer RNA-Komponente konnte bis heute nicht erbracht werden.

Gegenstand dieser Arbeit ist daher die Identifizierung und Analyse der Protein- und RNA-Untereinheiten der nukleären RNase P und MRP aus *Arabidopsis thaliana*. Im Focus steht dabei die Analyse der proteinkodierenden mRNAs und deren Spleißschemata durch *rapid amplification of cDNA ends* (RACE) und Northern Blot. Mit den Sequenzinformationen können die entsprechenden Proteine kloniert und heterolog exprimiert werden. Für Funktionsstudien und zur Antikörperherstellung werden die Proteine in reiner Form dargestellt. Diese spezifischen Antikörper dienen dazu, in Proteinlysaten von *A. thaliana* und anderen Pflanzen die Existenz dieser Proteine und ihre Assoziation mit RNase P oder MRP nachzuweisen.

Daneben soll die Expression der beiden bekannten RNase P/MRP RNAs aus *A. thaliana* und ihrer Homologen in *T. aestivum* durch Northern Blot nachgewiesen, sowie deren Termini durch RACE bestimmt werden. Für Struktur- und Funktionsstudien werden die RNA-Gene kloniert und durch T7-Transkription in größeren Mengen hergestellt.

Die Verifizierung der Proteine als RNase P/MRP Untereinheiten soll durch Komplexbildungsexperimente mit RNase P/MRP RNA geschehen. Da in RNase P und RNase MRP die Mehrzahl der Proteinuntereinheiten identisch sind, können für diesen Zweck die beiden in *A. thaliana* identifizierten RNase P/MRP RNAs eingesetzt werden.

Durch Immunopräzipitation (IP) könnte die Assoziation der einzelnen Proteinuntereinheiten mit dem aktiven RNase P/MRP-Holoenzym nachgewiesen werden. Die anschließende Western Blot-Analyse der Immunopräzipitate mit spezifischen Antikörpern für andere RNase P/MRP Proteinuntereinheiten soll als Nachweis der anderen Proteine durchgeführt werden. Ein weiteres Ziel ist der Nachweis einer essentiellen RNA-Untereinheit bzw. weiterer assoziierter RNAs durch einen RNomics-Ansatz.

2. Material

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Antikörper

Antigen	Bezeichnung	Hersteller	Herkunft	Verdünnung
AtPOP1p (ExonI)	α -POP1 #2293	Eurogentec h	Kaninchen, polyklonal	1:30000
	α -POP1 #2294	Heubeck, 2003	Kaninchen, IgG-Fraktion	1:1500
AtRpp30-0p	α -Rpp30 #0001	Eurogentec h	Kaninchen, polyklonal	1:2000
AtRpp38p	α -Rpp38 #3706	Eurogentec h	Kaninchen, polyklonal	1:20000
AtRpp29p	α -Rpp29 #1043	Eurogentec h	Kaninchen, polyklonal	1:12000
Kaninchen	Goat anti-rabbit IgG (H+L) - AP	Sigma	Ziege	1:10000
Kaninchen	Goat anti-rabbit IgG (H+L) - HRP	Sigma	Ziege	1:5000
Kaninchen	Goat anti-rabbit IgG (H+L) - HRP	Pierce	Ziege	1:2500

2.1.2 Bakterien

<i>Escherichia coli</i> <i>TOP10F</i>	Genotyp: F'; <i>mcrA</i> ; Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>); Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15; Δ <i>lacX74</i> ; <i>recA1</i> ; <i>araD139</i> ; Δ (<i>ara-leu</i>)7697; <i>galU</i> ; <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (StrR); <i>endA1</i> ; <i>nupG</i> ; λ - Transformation mit pCRII-TOPO bzw. pCR-XL-TOPO Blau-Weiß-Selektion nach Zugabe von X-Gal
<i>Escherichia coli</i> <i>DH5α</i>	F'; <i>endA1</i> ; <i>hsdR17</i> (<i>r_K-m_K</i>); <i>glnV44</i> ; <i>thi-1</i> ; <i>recA1</i> ; <i>gyrA</i> (NalR); <i>relA1</i> ; Δ (<i>lacIZYA-argF</i>)U169; <i>deoR</i> (Φ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15) Vermehrung von Plasmiden Transformation mit ligierten Vektorkonstrukten Blau-Weiß-Selektion nach Zugabe von X-Gal
<i>Escherichia coli</i> Rosetta(DE3)pLysS	<i>recA</i> ⁻ ; <i>endA</i> ⁻ ; <i>lac</i> ⁻ ; <i>lon</i> ⁻ ; <i>ompT</i> ⁻ ; pLysS (CamR) DE3-Lysogen kodiert T7-Polymerase Seltene tRNAs im pLysS-Plasmid Expression der rekombinanten Proteine im präparativen Maßstab

2.1.3 Pflanzenmaterial

<i>Arabidopsis thaliana</i> var. Columbia	eigene Anzucht
<i>Nicotiana tabacum</i> var. Samsun	Universität Leipzig, Fakultät für Biologie
<i>Triticum aestivum</i>	SynPharma, Augsburg
<i>Vigna radiata</i>	lokaler Supermarkt
<i>Brassica rapa</i> var. Pekinensis	lokaler Supermarkt
<i>Lepidium sativum</i>	lokaler Supermarkt
<i>Eruca sativa</i>	lokaler Supermarkt

2.2 Molekularbiologisches Material

2.2.1 Plasmidvektoren

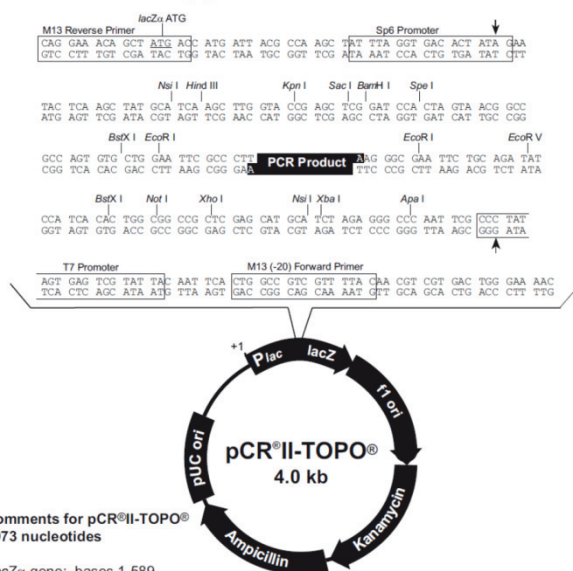


Abb. 12: pCRII-TOPO

Dieser Vektor ist Teil eines Kits der Firma Invitrogen. Er wurde für die Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhang verwendet. Der Vektor besitzt ein Lac-Operon, das eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht.

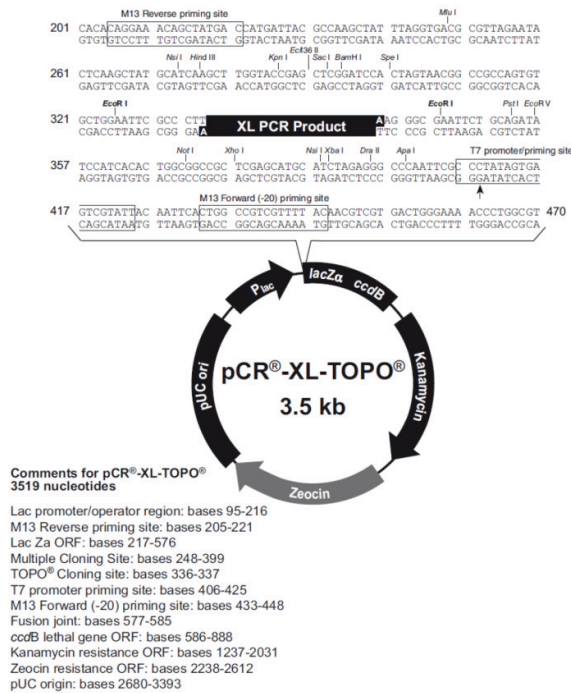


Abb. 14: pUC19

Dieser Vektor wurde für Blunt-End-Klonierungen verwendet. Er lässt sich leicht in *E. coli* DH5α propagieren. Auf der linken Seite ist die Sequenz der *multiple cloning site* (MCS) dargestellt, rechts die in BioEdit erstellte Vektorkarte.

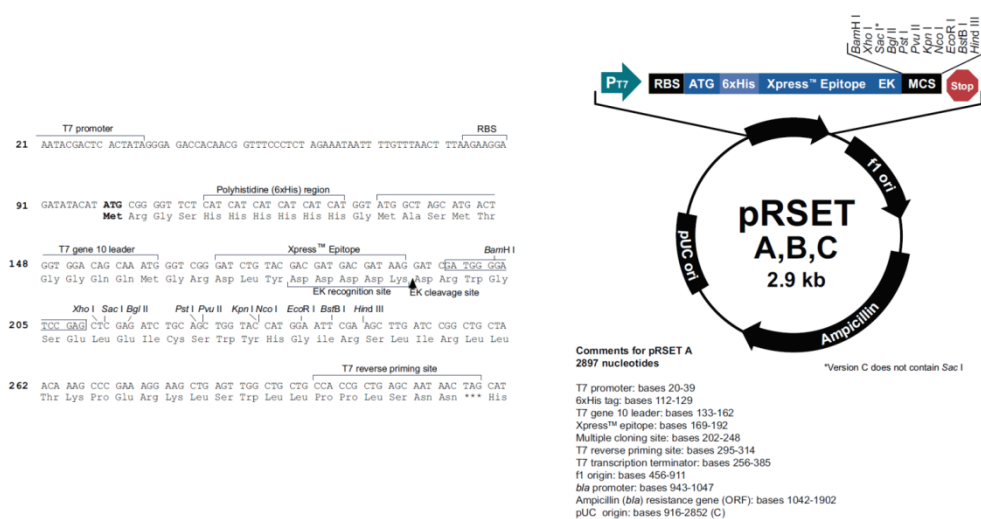


Abb. 15: pRSET-A

Dieser Vektor der Firma Invitrogen wurde für die Überexpression der Proteine verwendet. Auf der linken Seite ist die Sequenz vom T7-Promotor bis zur *multiple cloning site* dargestellt, rechts die Vektorkarte.

2.2.2 Enzyme

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
DNase I (RNase-frei)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	eigene Herstellung
Poly(A)-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Proteinase K	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. M., MBI Fermentas, St. Leon-Rot Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase AMV	Promega, Madison, USA
Reverse Transkriptase M-MuLV	Promega, Madison, USA
RiboLock™ <i>Ribonuclease Inhibitor</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase H	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Terminale Transferase	Roche, Mannheim
T4-Polynucleotidkinase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	eigene Herstellung

2.2.3 Oligodesoxynukleotide

Name	Sequenz	T _m (°C)
3'ATMRP2-FokHind	cgcaagcttggatgtccggatccaaaaTTGTTGTCATTGGAAC	82/44
3'MRP1-deltaP3	GGACTTTCCTGGGTGGACACCCATTCACTTCG	108
3'MRP-1u2-anti4	AAGCTCCACACACGCGTCTC	64
3'MRP-1u2-anti5	GATTCTCTCGTTACCGAGGC	62
3'MRP2-anti	TTGTTGTCATTGGAACATAAGC	60
3'MRP-anti	TGAAACGTAAGCCCCG	50
3'MRP-anti2	GTTGCTTGTCATTGAAAC	50
3'MRP-anti3	CCCGTTCAGTTAGTCC	50
3'MRP-FokHind	cgcaagcttggatgtccggatccaaaaGTTGCTTGTCATTGAAAC	82/50
3'MRPSdomainFokHind	gcaagcttggatgtccggatccaaaaGGGCCATGATATC	78/40
3'PlantMRP-CRV-antiA	TAAGCCCCGTTTCAGTTA	50
3'PlantMRP-CRV-antiT	TAAGCCCCGTTCTGTGA	50
3'UAP kurz	GTCACGCGTCGACCTAC	56
5'ATMRP2-EcoT7	cggaattctaatacgactcactatagggACAATAGTCATTG	98/34
5'MRP	CAGGAAAGTCCCCGG	50
5'MRP1deltaP3	CGAAGTGAATGGGTGTCCACCCAGGAAAGTCC	108
5'MRP2	CAATTGTCACTGGACG	48
5'MRP2_1	CAATTGTCACTGGACGAAGTG	62
5'MRP2_fw	CAATAGTCATTGGACAAAGTG	58
5'MRP-EcoT7	cggaattctaatacgactcactatagggACAATTGTCACTG	98/36
5'MRPSdomainEcoT7	cggaattctaatacgactcactataGGGCCACTTATCC	86/42

5'PlantMRP-CRI	CCAGGAAAGTCCCCGG	54
Anker (Roche)	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	70
Anker2	cggacgtcacgcgtcgacctac(T) ₂₀	74/40
Anker-BRL	GCCACGCGTCGACTAGTACGGGIGGGIGGGIG	62/52
ATMRP-P3-bot	CGCGGATGTCGGATCCTGGGTCGGAACCTTGGACA AGCCCATATGACCCTATAGTGAGTCGTATTAGCG	53
ATMRP-P3-top	CGCTAATACGACTCACTATAGGGTCATATGGGCT TGTCCAAGTTCCGACCCAGGATCCGACATCCGCG	53
ATPOP1-F	ATGGCTACTACTGCGAATGG	60
ATPOP1-GSP10R	CAGTTCCTATGCCGTCACC	60
ATPOP1-GSP11R	GTTCTCAGCCTCTTAGTTCC	60
ATPOP1-GSP12R	CTCCTCCTGATACTTGACC	58
ATPOP1-GSP15RHyb	GTGAGCCCTGCCTCTGG	58
ATPOP1-GSP15R-Hybtemplate	atCCAGAGGCAGGGCTCACgattctcatCCAGAGGCAG GGCTCACat	58
ATPOP1-GSP17RHyb	GAGTGAGCCCTCTGGACC	60
ATPOP1-GSP2R	CATAGTGAATCGTTTAGCGTGC	64
ATPOP1-GSP3F	GCTACTAGAGCCTTCTCCGTC	66
ATPOP1-GSP4F	GGAGCTCATGCAATAGGTCAG	64
ATPOP1-GSP5R	GGTGACATGGATACTATTCC	58
ATPOP1-GSP6R	CAATCGCCTGAGAACTGG	58
ATPOP1-GSP7R	GCCAGTGAGAATAGAGTCG	58
ATPOP1-GSP8R	CCTTCACTGAAGGAAGAAGC	60
ATPOP1-GSP9R	GCAATGTGATAGCTTGCATC	58
ATPOP1-R	TCAAGAATAAGTGTGAATGCC	58
ATPOP1-R2	TCACAAAAATAACCTCAAAAG	54
ATPOP1-R2-Xma	gcacccggGTCACAAAAATAACCTCAAAAG	30/58
ATRpp29-F	ATGGGTACAGAGACGGTTGTGC	68
ATRpp29-GSP1	CAAAGGGAACCTATAGTAGACAAG	64
ATRpp29-GSP2R	TTGAATCTTCCCGGTCACC	58
ATRpp29-GSP3F	CTCAGCAGATCTTCATGGTGC	64
ATRpp30-F	GGGATTCTTCGATCTTAGC	56
ATRpp30-FXho	gcgctcgaggTGGGATTCTTCGATC	36/44
ATRpp30-GSP1	CTATTCAAGCGAGGGATTTAC	58
ATRpp30-GSP2R	GCAAGCCATCAAGAACAGAG	60
ATRpp30-GSP3	CGAGCGGTGAAGGTGACATGC	68
ATRpp30-GSP4F	GATGCATATCACTGAGTCTGG	62
ATRpp30-GSP5R	GACCTCTAAGTTCTGTGACTG	62
ATRpp30-R	GTCTTGATGCTTCGTCATGG	60
ATRpp30-R2	GATTTGCAAATGAGGAACTTAG	62
ATRpp30-R3	CATTGAAGAGCTTGATCATTC	58
ATRpp30-RHind	cgcaagctTAGTCTTGATGCTTCG	26/46
ATRpp38-F	GAGAGGCGTCACAC	46
ATRpp38-GSP1F	CCAAGCATATACCCAACCTTAGC	64
M13for (-20)	GTAAAACGACGGCCAG	50
M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC	50
Oligo(dT)Anker (Roche)	gaccacgcgtatcgatgtcgac(T) ₁₆	70/32
Oligo(dT)Anker(V)	(T) ₁₆ (V)	

POP1-3'ss	AGGAAGGGGATCTAGGG	54
POP1-5'ss	CTTCCGTGTAAACCAAGAG	56
PUCrev	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	68
PUCuni (-40)	GTTTTCCCAGTCACGAC	52
UAP (Anker2)	CGGACGTCACGCGTCGACCTAC	74
UAP-BRL	GCCACGCGTCGACTAGTAC	62
WG-MRP1-anti	ACGGACCAAGTGAATAAC	52
WG-MRP2-anti	GGGCTCCACACTCGTCTC	60
WG-MRP3-anti	GCGCATCGGGCCCCGGG	60

T_m ist die berechnete Annealing-Temperatur der Primer. Bei Primern mit einer *core*- sowie *tail*- oder *linker*-Sequenz werden diese durch eine Kleinschreibweise der Basen gekennzeichnet und die Schmelztemperatur gesondert betrachtet. Die *tail*-Sequenz enthält oftmals Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen. Alle Primer wurden von Eurogentech bezogen. V: A, C oder G.

2.2.4 Längenstandards

DNA

Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker, 3	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
pUC Mix, 8	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
100Bp	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
1Kb	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
100Bp	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
1Kb	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
pUC19 HpaI	eigene Herstellung
DNA-Marker LowRange	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

RNA

RiboRuler High Range RNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNA Markers	Promega Corporation, Mannheim

Protein

High Molecular Weight Marker	Serva, Heidelberg
Low Molecular Weight Marker	Serva, Heidelberg
Unstained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Biorad, München

2.3 Chemikalien

Bis auf die unten aufgeführten Produkte wurden alle verwendeten Chemikalien von AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) in Analysequalität bezogen. Für das Ansetzen von Waschlösungen, Färbe- oder Entfärbelösungen wurden Alkohole in technischer Qualität verwendet.

Bovines Serum Albumin (BSA)	Invitrogen, Erlangen
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP-Set)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Freiburg

Hefeextrakt

Nukleotidtriphosphate (NTP-Set)
NuSieve GTG Agarose, low melting
Oligo(dT) Agarose

GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley,
Schottland
MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Cambrex Bio Science, Rockland, ME USA
GE Healthcare, Freiburg

2.4 Kits

PCR Purification Kit
QIAquick Gel Extraction Kit
TOPO TA Cloning Kit
TOPO XL PCR Cloning Kit
WizardSV Gel and PCR Clean-Up System
Pierce Crosslink Immunoprecipitation Kit
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit

Roche, Mannheim
Qiagen, Hilden
Invitrogen, Karlsruhe
Invitrogen, Karlsruhe
Promega Corporation, Mannheim
Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Stratagene, LaJolla, CA, USA

2.5 Software, Programme, Datenbanken

Adobe Acrobat Standard 6.0
Adobe Photoshop CS Version 8.0.1
AlphaEase FC
BioEdit Sequence Alignment Editor

Blast
Chromas Version 1.45
CorelDRAW 12
Microsoft Office 2003
Pubmed
PDB Protein Workshop 3.4
Reference Manager 11
The Sequence Manipulation Suite
Visual Cloning 2000
Webcutter 2.0
WU-Blast

Adobe Systems GmbH, München
Adobe Systems GmbH, München
Biozym Scientific GmbH
<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
<http://technelysium.com.au/chromas.html>
Corel, Unterschleißheim
Microsoft, Unterschleißheim
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
Thomson Research Soft
<http://bioinformatics.org/sms/>
Redasoft, Toronto, Kanada
<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>
<http://blast.wustl.edu/>

2.6 Laborgeräte

Autoklav V-150 Systec
Destille Water still A4000D
Eismaschine AF 100 Scotsman
Elektrophoresekammer i-Mupid
Gefrierschrank -20°C Premium_no_frost
Gefrierschrank -80°C Forma-86C ULT
Freezer
Laborschüttler Ika KS 260 Basic
Magnetrührer MR 3001K
Mikrowelle MW 500 PROFI

Laborsystemtechnik, Wettenberg
Aquatron, Kungsham, Schweden
Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Cosmo Bio Co Ltd., Eurogentec, Köln
Liebherr, Biberach an der Riss
Thermo electron corporation, Marietta, OH, USA
IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Heidolph, Schwabach
AEG, Aachen

PCR-Thermocycler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
pH-Meter pH 740 WTW	Inolab, Weilheim
Phosphorimager Storm 860	GE Healthcare, Freiburg
Photometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Research (2,5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg
Roto Shake Genie	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Roller Mixer SRT1	Bibby Sterilin LTD., Staffordshire, UK
Schüttler Forma orbital shaker	Thermo electron corporation, Marietta, OH, USA
Speed Vac SPD	Thermo Servant, Holbrook, NJ, USA
Spülmaschine Professional G 7883 CD	Miele, Gütersloh
Sterilbank HeraSafe HSP 12	Heraeus, Langenselbold
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank FD 240	Binder, Tuttlingen
Ultra-Turrax T25 basic	IKA-Werke, Staufen
UV-Transluminator mit Videokamerasystem	Biozym, Hess. Oldendorf
Alphaimager™ Biozym/Alpha Innotech	
Vortexer Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage Sartorius CP 3202 S	Sartorius, Göttingen
Waage-Feinwaage Sartorius CP 64	Sartorius, Göttingen
Wasserbad 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator	LKB Bromma, Schweden
Wasserbad Memmert WB 22	Memmert GmbH, Schwabach
Zentrifuge 5415 C, Rotor: F45-18-11	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415 R, Rotor: F45-24-11	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810 R, Rotor: A-4-81	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sorvall RC28-S	Beckmann, Krefeld

3. Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Glas- und Plastikgefäße sowie Lösungen und andere Verbrauchsmaterialien wurden vor Gebrauch 20 min bei 120 °C, 2 bar autoklaviert. Lösungen mit Spurenelementen und Salzlösungen, die nicht autoklaviert werden können, wurden in sterilem Wasser angesetzt und durch einen sterilen Rundfilter (Porengröße = 0,45 µm) filtriert.

Alle Bakterienkulturen wurden von einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C und 220 U/min kultiviert. In Lösungsmittel-/Puffertabellen sind die Endkonzentrationen verzeichnet.

3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.1 Fällung von Nukleinsäuren

3.1.1.1 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Für die Isolierung von DNA bzw. RNA aus einer biologischen Probe oder enzymatischen Reaktion wird die Ethanolpräzipitation verwendet. Dabei werden organische Kontaminationen entfernt und die DNA bzw. RNA als Natriumsalz präzipitiert.

Mit Hilfe der Na⁺-Ionen kann die negative Ladung der Nukleinsäuren größtenteils kompensiert werden. Dadurch fällt die Nukleinsäure in 70 % ethanolischer Lösung mit hoher Ausbeute aus. Die meisten Proteine sind im Überstand enthalten.

Zu der DNA/RNA-Lösung werden 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 und 2,5 Volumen 96 % Ethanol gegeben. Nach gründlichem Mischen wird 1 h bei -20 °C oder 30 min bei -80 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 16000 x g; 4 °C) wird der Überstand mit einer Pipette abgesaugt. Das Sediment wird mit dem gleichen Volumen 70 % Ethanol gewaschen, nochmals für 5 min zentrifugiert, 5 min im Exsikkator unter Vakuum getrocknet und in einem entsprechenden Volumen ddH₂O bzw. TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer	
Tris-HCl, pH 8	10 mM
Na ₂ EDTA	1 mM

3.1.1.2 Isopropanolfällung von Plasmid-DNA

Um das Fällungsvolumen gering zu halten, können Plasmidpräparationen mit Isopropanol gefällt werden. Isopropanol hat gegenüber Ethanol den Vorteil, dass ein kleineres Volumen erforderlich ist. Da es Salze schlechter löst, erhöht Isopropanol die Copräzipitation der Na-

Ionen mit der DNA. Eine weitere nachteilige Eigenschaft ist seine geringe Flüchtigkeit, weshalb es schwerer zu entfernen ist als Ethanol.

Zum klaren Lysat einer Mini-Plasmidpräparation (400 µl) werden 0,5 ml Isopropanol gegeben und gut gemischt. Nach 15 min Inkubation bei RT wird zentrifugiert (20 min, 16000 x g, 4 °C). Der Überstand wird vorsichtig mit einer Pipette abgezogen. Das Sediment wird zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und anschließend im Exsikkator getrocknet. Das DNA-Pellet wird in 20 µl TE-Puffer mit RNase A (0,5 µg/ml) aufgenommen.

3.1.2 Entfernung niedermolekularer Substanzen aus Nukleinsäurelösungen

Für diese Art der Reinigung werden Mikrofiltrationssäulen (Microcon, MWCO: 30 kDa) verwendet. Durch Zentrifugation (4 min, 10000 x g) werden niedermolekulare Substanzen wie Primer und Salze abgetrennt. Große Moleküle werden zurückgehalten und können anschließend zurückgewonnen werden. Die Säule wird vor Gebrauch zweimal mit 200 µl ddH₂O gewaschen. Die zu reinigenden Nukleinsäuren werden mit ddH₂O auf 200 µl aufgefüllt und auf die Säule gegeben. Das Volumen wird durch Zentrifugation auf ca. 1/10 eingengt, die Probe sollte dabei nicht austrocknen, da dadurch das Resuspendieren erschwert wird. Nun wird die Probe noch zweimal mit 100 µl ddH₂O gewaschen. Die entsaltze Nukleinsäure wird in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen (Vortexer Genie 2) und bei invertierter Lage der Microcon-Säule durch Zentrifugation (4 min, 5000 x g) komplett in ein steriles 1,5 ml Gefäß überführt.

3.1.3 Reinigung von Nukleinsäurelösungen durch Phenolextraktion

Um störende Substanzen wie Proteine, Lipide usw. aus Nukleinsäurepräparationen zu entfernen, wird die Lösung mit 1 Volumen einer Lösung aus TE-gesättigtem Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1; pH 8,0) extrahiert. Nach der Zentrifugation zur Trennung der Phasen enthält die obere wässrige Phase die Nukleinsäuren und wird abgenommen. Die Phenolphase wird nochmals mit 1 Volumen TE-Puffer gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden anschließend zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und die Nukleinsäuren der Oberphase mit Ethanol gefällt (3.1.1).

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.1.4.1 Spektrofotometrische Konzentrationsbestimmung

Die optische Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen erfolgt bei 260 nm und einer Schichtdicke von 10 mm. Ein Messwert von 1 entspricht 50 µg/ml für dsDNA bzw. 40 µg/ml

für RNA. Zur Bestimmung der Reinheit des Präparates wird zusätzlich bei 280 nm und 230 nm gemessen. Der Quotient A_{260}/A_{280} sollte für reine DNA bzw. RNA einen Wert von 1,8 bzw. 2,0 erreichen. Kontamination mit Protein senkt diesen Wert und eine exakte Quantifizierung ist nicht mehr möglich. Der Quotient E_{260}/E_{230} sollte mindestens einen Wert von 2,0 erreichen. Dieser gibt an, ob die Probe aromatische Verbindungen wie z.B. Phenol enthält. Für die Messungen werden sowohl Quarzküvetten als auch Kunststoffküvetten benutzt, die bei diesen Wellenlängen nicht absorbieren.

3.1.4.2 Konzentrationsabschätzung mittels interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe

Hat man nur kleine Mengen von DNA zur Verfügung, oder stören enthaltene Substanzen (Detergenzien, Proteine, aromatische Verbindungen, Nukleotide) die UV-Absorption, ist ein schneller Nachweis die durch UV-Licht (312 nm) induzierte Fluoreszenz von Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert. Zur Quantifizierung wird eine DNA-Standardreihe bekannter Konzentrationen im Bereich 10-150 ng/µl verwendet. Diese Methode der Konzentrationsbestimmung kann für die Agarosegelelektrophorese oder auf Agaroseplatten verwendet werden.

Zur Durchführung des Tüpfeltests wird je 1 µl der DNA-Probe und der Standards auf eine Petrischale mit 0,8 % Agarose, 5 µg/ml EtBr aufgetragen. Die Platte wird im Dunkeln gelagert, bis die Proben ins Gel diffundiert sind. Unter UV-Licht wird dann die Konzentration mit Hilfe der Standardreihe abgeschätzt.

3.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismen

3.1.5.1 Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab

Von 2 ml einer LB-Übernachtskultur (mit entsprechendem Antibiotikum), inokuliert mit einer Einzelkolonie, werden 1,5 ml im Eppendorfgefäß abzentrifugiert (5 min, 16100 x g, 4 °C). Bei *low copy*-Plasmiden werden zweimal 1,5 ml sedimentiert. Das Zellpellet wird in 100 µl Lösung I resuspendiert, bis alle Zellen gut gelöst sind und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 200 µl Lösung II zugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Suspension darf nicht mit dem Vortexgerät gemischt werden, da sonst die chromosomale DNA geschert und die Plasmidpräparation verunreinigt wird. Zusätzlich verursacht es ein schäumen des enthaltenen SDS. Nach 5 min im Eis wird 150 µl eiskalte Lösung III zugegeben und das Gefäß geschwenkt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wird die Lösung kräftig geschüttelt. Anschließend werden die ausgefällten Proteine und die chromosomale DNA durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 16100 x g, 4 °C). Der Überstand (ca. 400 µl) wird in

ein neues Eppendorfggefäß überführt, das Sediment wird verworfen. Die Plasmidpräparation wird nochmals zentrifugiert, um ein klares Lysat zu erhalten. Wird eine hohe Reinheit der Nukleinsäurepräparation verlangt, kann anschließend eine Phenolextraktion (3.1.3) durchgeführt werden.

Lösung I		Lösung II		Lösung III	
Glukose	50 mM	SDS	1 % (w/v)	KOAc	3 M
Na ₂ EDTA	10 mM	NaOH	0,2 M	Eisessig	10 % (v/v)
Tris-HCl, pH 8	25 mM	Tris-HCl, pH 8	10 mM		
Lysozym	4 mg/ml	Na ₂ EDTA	1 mM		

3.1.5.2 Maxi-Plasmid-Präparation

Die präparative Reinigung von Plasmiden wurde mit dem Kit Nukleobond AX (Macherey-Nagel) durchgeführt. Eine 100 ml-Kultur wird lysiert, die zirkuläre DNA an die Anionenaustauschermatrix (Nucleobond AX100) gebunden und daraus eluiert. Anschließend folgt eine Isopropanolfällung. Das Präzipitat wird in 500 µl TE-Puffer aufgenommen und optisch vermessen (3.1.4.1).

3.1.6 Präparation genomischer DNA aus Pflanzen

Die hier verwendete Methode zur DNA-Extraktion wurde nach dem Protokoll von Saghai-Maroo et al. (1984) durchgeführt.

Für eine Extraktion von DNA aus Blattmaterial muss folgendes beachtet werden. Zuerst müssen die Zellwände vollständig aufgebrochen werden, indem das Material im Mörser mit Stickstoff oder Trockeneis zerrieben wird. Das Aufbrechen der Membranen im zweiten Schritt wird mit Hilfe von Detergenzien, wie z.B. SDS oder CTAB, erreicht. CTAB hat den Vorteil, dass der Anteil an enzyminhibierenden Polysacchariden in der gewonnenen DNA sehr gering ist. Die DNA in dem aufgeschlossenen Material muss unbedingt vor Nukleasen geschützt werden. Schon die Auswahl des Blattmaterials kann hier bedeutend sein, da der Anteil an Nukleasen zunimmt, je weiter das Blatt vom Blattgrund entfernt ist. Neben dem verwendeten Detergens schützt auch Na₂EDTA, das Mg²⁺-Ionen chelatisiert, vor nukleolytischem Abbau. Es muss aber beachtet werden, dass in Pflanzen zwei Typen von Nukleasen existieren. Der erste Typ wird durch Mg²⁺-Ionen stimuliert und kann durch Na₂EDTA inhibiert werden, während der zweite Typ davon unabhängig ist (Guerriero und Dunham, 1979; Yen und Green, 1991; Green, 1994). Deshalb ist es notwendig, dass das Blattmaterial vor dem Auftauen geschützt wird. Ein weiterer Schritt, um ein Degradieren zu verhindern, bietet die anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion des Gewebes. Durch

Phenol werden Proteine denaturiert und von der DNA in der wässrigen Phase abgetrennt. Um möglichst langkettige DNA zu erhalten, müssen Scherkräfte, die beim Mischen der Lösungen auftreten, vermindert werden.

Zum Aufschluss des Blattmaterials werden 100 mg tiefgefrorene Blätter im Mörser mit dem 2-3 fachen Volumen Trockeneis zerrieben. Das feine Pulver wird mit 9 ml 65 °C warmen Extraktionspuffer gemischt und 1 h bei 65 °C im Hybridisierungssofen unter leichtem Rühren inkubiert. Anschließend wird die Probe auf RT abgekühlt. Nun werden zweimal 4,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, 5-10 min leicht geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt (10 min, 1000 U/min, Eppendorf RC1545C). Die wässrige Phase wird nun mit 30 µl RNase A-Lösung für 30 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 6 ml Isopropanol wird die DNA gefällt und anschließend zentrifugiert (20 min, 10000 x g). Die DNA wird in 1 ml TE-Puffer unter leichtem Schütteln über Nacht gelöst. Die DNA-Lösung wird dann zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Zur resultierenden wässrigen Phase werden 50 µl 5 M NaCl und 2,5 ml EtOH (2,5 faches Volumen) gegeben. Die DNA wird nochmals zentrifugiert und gewaschen. Zum Schluss wird die DNA in 1 ml ddH₂O gelöst und optisch vermessen (3.1.4.1).

Extraktionspuffer		Waschlösung	
Tris-HCl, pH 7,5	100 mM	EtOH	76 % (v/v)
NaCl	700 mM	NaOAc	0,2 M
Na ₂ EDTA	50 mM		
CTAB*	1 % (w/v)		
β-Mercaptoethanol ⁺	140 mM		

* vor Zugabe Lösung auf 65 °C erhitzen,

⁺ kurz vor Verwendung zugeben

3.1.7 Präparation von RNA aus Pflanzen

Die RNA-Präparation aus pflanzlichem Material erfolgt nach der modifizierten Variante von Logemann et al., 1987. 5 g frisches oder tiefgefrorenes Blattmaterial wird mit Trockeneis im Mörser zerkleinert. Dazu werden 25 ml Extraktionspuffer gegeben und die Suspension für 10 min bei 4 °C geschüttelt. Die unlöslichen Bestandteile werden durch Zentrifugation (20 min, 3200 x g) abgetrennt. Der Überstand wird mit 25 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Zum Trennen der Phasen wird abermals zentrifugiert (5 min, 3200 x g). Die phenolische Unterphase wird mit 25 ml TE-Puffer aufgefüllt, geschüttelt und zur Trennung der Phasen wieder zentrifugiert. Die wässrigen Phasen werden zweimal mit je 25 ml Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

Der resultierende Überstand wird mit 0,2 Volumen 1 M HOAc und 0,7 Volumen EtOH p.a. gemischt, über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt und für 30 min bei $16000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal in 3 M NaOAc, pH 5,2 gewaschen und wieder für 10 min zentrifugiert. Zum Schluss wird kurz mit 70 % EtOH gespült und das Pellet im Exsikkator getrocknet. Anschließend wird die RNA in 2,5 ml TE-Puffer gelöst und optisch vermessen (3.1.4.1).

RNA Extraktionspuffer	
GuaHCl	8 M
Tris-HCl, pH 7	20 mM
Na ₂ EDTA	20 mM
β -Mercaptoethanol	50 mM

3.1.7.1 Isolierung von mRNA aus einer *Arabidopsis thaliana* RNA-Präparation

Die Isolierung von mRNA wird durch Chromatografie an Oligo-dT-Cellulose erreicht. Da eukaryotische mRNAs polyadenyliert sind, hybridisieren diese mit den Thymidinketten in der Matrix, während nicht-polyadenylierte RNAs im Überstand bleiben. Da auch nichtkodierende RNAs in *Arabidopsis* einen sehr hohen Adenin/Thymidin-Anteil haben, muss die Anreicherung der mRNAs mehrmals hintereinander durchgeführt werden.

Vor dem Binden der mRNAs wird 0,1 g Säulenmatrix zweimal mit 2 ml Elutionspuffer und zweimal mit 2 ml Bindungspuffer durch rotierende Bewegungen im 15 ml Röhrchen äquilibriert. Der Überstand wird durch 5 minütige Zentrifugation bei $100 \times g$ abgetrennt. Die extrahierte RNA wird auf 0,5 M NaCl eingestellt und mit der äquilibrierten Oligo-dT-Cellulose 30 min im Falcon geschüttelt. Nach Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Sediment zweimal mit 2 ml Bindungspuffer und zweimal mit 2 ml Bindungspuffer 1 für 5 Minuten geschüttelt und danach sedimentiert. Das letzte Sediment wird noch einmal in 2 ml Bindungspuffer 1 resuspendiert und in eine sterile Einwegspritze mit Luer-Lock-Verschluss gegeben. Die Spritze wird auf eine autoklavierte Mobicol-Säule (MoBiTec) mit einem Filter (Porengröße $90\text{ }\mu\text{m}$) geschraubt und das Gemisch wird in die Säule gedrückt. Die Elution erfolgt mit Elutionspuffer bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das Eluat wird in 0,3 ml Aliquots gesammelt und anschließend gefällt (3.1.1). Die Ausbeute und Reinheit der RNA wird spektralfotometrisch bestimmt (3.1.4.1).

Bindungspuffer		Bindungspuffer 1		Elutionspuffer	
TE-Puffer, pH 8		TE-Puffer, pH 8		TE-Puffer, pH 8	
SDS	0,2 %	SDS	0,2 %	SDS	0,2 %
NaCl	0,5 M	NaCl	0,25 M		

3.1.7.2 Isolierung löslicher nichtkodierender RNAs (ncRNA)

Zur präparativen Gewinnung von ncRNAs wird eine modifizierte Variante der tRNA Präparation von Roe (1974) verwendet. Dazu wird 1 g Pflanzenmaterial mit dem gleichen Volumen eiskalten TE-Puffer gemörstert und anschließend mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (pH 5) für 15 min geschüttelt. Durch Zentrifugation (5 min, 3200 x g) wird die Oberphase abgetrennt. Sowohl die Ober- als auch die Unterphase werden nochmal mit Phenol/Chloroform bzw. TE-Puffer extrahiert, die wässrigen Oberphasen vereinigt und mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Anschließend wird die NaCl-Konzentration der Oberphase mit einer 5 M NaCl-Lösung auf 2 M (2/3 Volumen) eingestellt und 1/2 h im Eisbad inkubiert. Mit diesem Schritt fällt ein Großteil der hochmolekularen ribosomalen RNAs und mRNAs aus, die durch Zentrifugation (20 min, 10000 x g) sedimentiert werden. Um das Volumen zu reduzieren und Salze zu entfernen, wird der Überstand zweimal mit Ethanol gefällt (3.1.1). Das Sediment mit den ncRNAs wird nun in TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute und Reinheit der RNA wird spektralfotometrisch bestimmt (3.1.4.1). Die Qualität und Zusammensetzung kann auf einem 8 % denaturierenden Polyacrylamidgel überprüft werden (3.2.3).

Wird anstelle von Blattmaterial trockenes Material (z.B. Weizenkeime) verwendet, wird dies zuerst im Mörser zu Pulver verrieben und mit dem doppelten Volumen eiskaltem TE-Puffer versetzt. Nach 20 min Inkubation bei 4 °C wird das gequollene Material mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Die weitere Behandlung geschieht wie oben beschrieben.

3.1.7.3 Fraktionierung einer Gesamt-RNA Präparation aus *Arabidopsis thaliana*

Da aus dem Blattmaterial von *A. thaliana* nur geringe Mengen RNA präpariert werden können, wurde in dieser Arbeit die Anreicherung kleiner RNA Populationen durch Fraktionierung über eine Anionentauschersäule (Nukleobond AX) nach Protokoll 5.5 des Herstellers durchgeführt. Die Wasch- bzw. Elutionsschritte wurden modifiziert, um die RNAs im Größenbereich zwischen tRNAs und kleinen mRNAs (ca. 0,5 kB) anzureichern. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit Puffer R1 und dem Binden der Probe folgen die Elutionsschritte mit R2, R2:R3 (1:1) und R3. Mit Puffer W6 werden sämtliche gebundenen Nukleinsäuren entfernt, um die Säule für weitere Anwendungen zu regenerieren.

Puffer	Tris-Acetat	Ethanol	KCl	pH
W6	200 mM	-	1500 mM	6,3
R1	100 mM	15 %	400 mM	6,3
R2	100 mM	15 %	900 mM	6,3
R3	100 mM	15 %	1150 mM	6,3

3.1.8 *In vitro* Transkription mit T7-RNA-Polymerase

Mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus dem T7-Phagen können DNA-Sequenzen, die unter Kontrolle des T7-Promotors stehen, *in vitro* transkribiert werden (Milligan und Uhlenbeck, 1989). Dazu muss die zu transkribierende DNA-Sequenz unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen. Da die Effizienz der T7-RNA-Polymerase erhöht ist, wenn die Startbasen des zu transkribierenden Gens Guanosine sind, beginnen alle konstruierten Gene mit drei konsekutiven Guanosinen. Das die RNA kodierende Plasmid wird durch eine geeignete Restriktions-Endonuklease linearisiert, um eine „Endlos-Transkription“ zu vermeiden und die Terminationsstelle für die Polymerase festzulegen. Anschließend erfolgt die Synthese der RNA in einer *run off*-Transkription.

3.1.8.1 *Nichtradioaktive in vitro* Transkription

Der Ansatz wird bei 37 °C für 1 h (für tRNAs), 5 h (für lange mRNAs) oder über Nacht (für hoch strukturierte RNAs) inkubiert. Um eine vorzeitige Hydrolyse des synthetisierten Transkripts durch RNasen zu unterbinden, kann dem Ansatz zusätzlich RNasin (Fermentas) beigelegt werden. Anschließend wird dem Reaktionsansatz 2 µl DNase I (10 U/µl) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wird mit 2,5 µl 0,5 M Na₂EDTA supplementiert, phenolisiert (3.1.3) und die aus der wässrigen Phase ausgefällten Nukleinsäuren (3.1.1) werden in TE-Puffer aufgenommen. Die Probe wird mit eingetrocknetem Harnstoffprobenpuffer gemischt und bei 94 °C für 2 min denaturiert. Die Auftrennung erfolgt über ein denaturierendes 8 % Polyacrylamidgel (20 x 20 x 0,1 cm; 3.2.3). Die Lokalisierung der RNA im Gel erfolgt mittels Fluoreszenzlöschung bei 254 nm (3.2.4.1) oder durch Anfärben mit Toluidinblau (3.2.4.2). Anschließend wird die RNA aus dem Gel eluiert (3.2.6). Das getrocknete Transkript wird in insgesamt 100 µl TE-Puffer gelöst und die Konzentration spektralfotometrisch bestimmt (3.1.4). Zur präparativen Herstellung von RNA wird eine 250 µl-Reaktion durchgeführt.

<i>in vitro</i> Transkriptionsansatz		Volumen/Menge
linearisiertes Plasmid	20 ng/µl	1 µg
rNTPs (A, C, U, G je 10 mM)	je 2 mM	10 µl
10 x Transkriptionspuffer	1 x	5 µl
T7 RNA Polymerase (20 U/µl)	1 U/µl	2,5 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,4 U/µl	0,5 µl
ddH ₂ O		ad 50 µl

10 x Transkriptionspuffer	
Tris, pH 8	400 mM
DTT	50 mM
Spermidin	10 mM
MgCl ₂	120 mM

3.1.8.2 Radioaktive T7-Transkription

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens der RNA an Proteine und Substrate oder zur Untersuchung der Struktur werden die Transkripte radioaktiv markiert, da dies eine sensitive Detektion kleinster Mengen ermöglicht. Dazu wird eines der rNTPs im Reaktionsansatz ganz oder teilweise durch das entsprechende α -³²P-markierte rNTP ersetzt. Der Ansatz wird für 16 h bei 37 °C inkubiert, mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt, phenolisiert, präzipitiert und das getrocknete Sediment in 30 µl TE-Puffer gelöst. Zur Trennung von Nebenprodukten wird das radioaktiv markierte Transkript mit Harnstoffprobenpuffer gemischt, für 2 min bei 94 °C erhitzt und auf einem denaturierenden 8 % Polyacrylamidgel (20 x 20 x 0.1 cm) aufgetrennt (3.2.3). Das Transkript wird durch Autoradiografie lokalisiert, ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (3.2.6). Um das Volumen zu verringern, werden die Nukleinsäuren gefällt (3.1.1.1). Das Präzipitat wird in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer gelöst, so dass sich eine Konzentration von 10000 cpm/µl ergibt. Durch Zugabe von 0,02 % (w/v) Triton X-100 kann die Löslichkeit des Sedimentes erhöht werden.

<i>in vitro</i> Transkription zur radioaktiven Markierung		Volumen/Menge
linearisiertes Plasmid	50 ng/µl	2,5 µg
rCTP, rUTP, rGTP (je 10 mM)	1 mM	5 µl
ATP (2 mM)	0,2 mM	5 µl
[α - ³² P]-ATP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl)	1 µCi/µl	5 µl
10 x Reaktionspuffer	1 x	5 µl
T7 RNA Polymerase (20 U/µl)	1 U/µl	2,5 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,4 U/µl	0,5 µl
ddH ₂ O		ad 50 µl

3.1.8.3 Berechnungen zur Radioaktivität

In dieser Arbeit wurde ausschließlich [α -³²P]-ATP und [γ -³²P]-ATP mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol und einer Konzentration von 10 µCi/µl verwendet. Da alle weiteren Reaktionen aber in cpm (*counts per minute*) gemessen werden, muss die spezifische Aktivität von µCi/mmol in cpm/fmol umgerechnet werden. Bei den Berechnungen muss außerdem beachtet werden, dass die Halbwertszeit von ³²P 14,3 Tage beträgt (siehe

nachfolgende Tabelle). Der hier verwendete Effektivitätsfaktor des Szintillationszählgerätes (E) wird durch eine Eichreihe bekannter Konzentrationen bzw. Radioaktivität bestimmt.

Rechnung	verbleibende Aktivität nach x Tagen	
$N_t = N_0 \cdot e^{-k \cdot t}$	1. Tag	95,3 %
$N_t/N_0 = e^{-k \cdot t}$	5. Tag	78,5 %
$\ln 1/2 = -k \cdot t_{1/2}$	10. Tag	61,6 %
$\ln 1/2 = -k$	20. Tag	37,9 %
$t_{1/2}$	25. Tag	29,7 %
$k = 0,693/14,3 \text{ Tage}$	33. Tag	20,2 %
$= 0,0485/\text{Tag}$		
<hr/>		
1Ci = $2,22 \cdot 10^{12}$ dpm		
<hr/>		
E = cpm/dpm (Effektivitätsfaktor des Szintillationszählgerätes)		
<hr/>		
x cpm/fmol = y Ci/mmol $\cdot 2,22 \cdot E$		
<hr/>		

3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

3.2.1 Native Agarosegelelektrophorese

Aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrats von Nukleinsäuren ist es möglich, diese in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufzutrennen. In Abhängigkeit der erwarteten Größe von DNA-Fragmenten bedient man sich unterschiedlicher Agarosekonzentrationen für die Auftrennung. Kleine Fragmente bis 0,5 kbp werden in Gelen mit 1,5-2 % Agarose und größere Fragmente (0,5 kbp bis 2 kbp) in 0,8-1 % Agarosegelen aufgetrennt. Ist eine hohe Auflösung weniger Nukleotide erforderlich, kann anstelle der LE-Agarose die engporige GTG-Nusieve-Agarose verwendet werden. Neben der Porengröße der Agarose, der angelegten Spannung und der Ionenstärke des Elektrophoresepuffers spielt auch die Konformation der DNA eine wichtige Rolle für den Siebeffekt bzw. die Mobilität der Nukleinsäuren im Gel. Ringförmige, superhelikale DNA wandert wegen ihrer geringen Oberfläche deutlich schneller als entspannte, ringförmige oder auch linearisierte DNA.

Für ein 1 % Agarosegel wird 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer 2 min bei 400 W in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Die engmaschige GTG-Agarose muss vorher für 20 min unter Rühren aufquellen. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wird die fluide Agaroselösung mit EtBr versetzt (0,25 µg/ml) und in einen Gelschlitten gegossen. Anschließend wird ein Taschenformer eingesetzt. Nachdem das Gel fest geworden ist, wird der Schlitten in eine Elektrophoreseapparatur gelegt und mit 1 x TAE überschichtet. Der Gelkamm kann jetzt herausgezogen werden. Die Proben werden mit 5 x Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wird noch ein DNA-Standard in eine freie Tasche aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgt bei 130 V für 15 min (Gelmaße L x B x H: 60 x 107 x 5 mm, Elektrodenabstand: 13 cm; i-Mupid). Die Fluoreszenz des interkalierten EtBr wird unter UV-Licht bei 312 nm angeregt und fotografiert. Die Längenbestimmung und Quantifizierung der DNA erfolgt mit Hilfe des DNA-Standards.

10 x TAE-Puffer		5 x Probenpuffer	
Tris-Acetat	0,4 M	Glycerin	50 % (v/v)
Na ₂ EDTA	10 mM	Na ₂ EDTA	25 mM
		XCFE	0,03 % (w/v)
		BPB	0,03 % (w/v)

3.2.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von RNA

Anders als dsDNA muss RNA unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden, um sie der Länge entsprechend auftrennen zu können. Da RNA einzelsträngig vorliegt, kommt es zur Bildung von Sekundärstrukturen, die das Laufverhalten ändern. Das wird durch Zugabe von Formaldehyd im Gel und im Probenpuffer verhindert. Für ein Gel mit den Maßen 12 x 14 cm werden 1,3 g Agarose mit 114,6 ml destilliertem Wasser erhitzt. Ist die Agarose gelöst, wird sie auf ca. 60 °C abgekühlt und mit 10 x FA-Gelpuffer, 37 % Formaldehyd und 1 % Ethidiumbromidlösung versetzt. Das Gel härtet 1/2 h lang aus und wird anschließend für 30 min Laufpuffer äquilibriert. Die RNA wird im Formamid-Probenpuffer für 5 min bei 65 °C erhitzt und danach sofort im Eisbad abgekühlt. Die Elektrophorese wird bei 100 V für ca. 2,5 h durchgeführt. Anschließend wird die RNA unter UV-Licht sichtbar gemacht.

denaturierendes Agarosegel		Volumen/Einwaage
Agarose	1 % (w/v)	1,3 g
10 x FA-Gelpuffer	1 x	13 ml
Formaldehyd (37 %)	0,7 % (v/v)	2,4 ml
EtBr (1 %)	0,03‰ (w/v)	4 µl
DEPC-H ₂ O		ad 130 ml

4 x RNA Probenpuffer		Volumen/Einwaage
10 x FA-Gelpuffer	1 x	4 ml
Na ₂ EDTA (0,5 M, pH 8)	4 mM	80 µl
Glycerin (86 %)	17 % (v/v)	2 ml
BPB (1 %)	0,03 % (w/v)	0,3 ml
Formamid	30 % (v/v)	3,084 ml
DEPC-H ₂ O		ad 10 ml

10 x FA-Gelpuffer	
MOPS	0,2 M
NaOAc	50 mM
Na ₂ EDTA	10 mM
pH 7 mit NaOH	

3.2.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Analyse von Nukleinsäuren

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) bietet eine effiziente und einfache Methode zur hochauflösenden Trennung von Oligonukleotiden. In Abhängigkeit von der Wahl der Acrylamidkonzentration können Oligonukleotide von 2-300 Basen mittels Elektrophorese getrennt werden.

Für ein Gel mit den Maßen 20 x 20 x 0,04 cm werden ca. 20 ml Gellösung benötigt. Die entgaste Lösung wird luftblasenfrei zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach Einsetzen des Taschenformers polymerisiert das Gel in horizontaler Lage. Anschließend wird das Gel vertikal in eine Gelapparatur eingespannt. An die Rückseite des Gels wird eine Aluminiumplatte angebracht, um die entstehende Wärme gleichmäßig zu verteilen. Die Proben werden vor dem Auftragen mit eingetrocknetem Harnstoff-Probenpuffer gemischt und durch Erhitzen (2 min, 94 °C) denaturiert, kurz zentrifugiert und dann auf Eis gestellt, um eine Renaturierung zu verhindern. Nach Auftragen der Proben und geeignetem Marker wird die Elektrophorese mit 0,5 x TBE Laufpuffer bis zum vollständigen Eintritt der Proben in das Gel mit 600 V (max. 10 W) durchgeführt. Anschließend wird die Leistung auf 20 W erhöht. Nach ca. 1-3 h können die Nukleinsäurebanden mittels Fluoreszenzlöschung (3.2.4.1), Toluidinblaufärbung (3.2.4.2) oder Autoradiografie detektiert werden.

PAA-Gel		Volumen/Einwaage	
		15 %	8 %
AA:BisAA (40 %, 29:1)	15 bzw. 8 % (v/v)	11,25 ml	6 ml
10 x TBE	1 x	1,5 ml	1,5 ml
Harnstoff	8 M	14,41 g	14,41 g
APS	1 % (w/v)	0,3 ml	0,3 ml
TEMED	0,1 % (v/v)	0,03 ml	0,03 ml
ddH ₂ O		ad 30 ml	ad 30 ml

Harnstoff Probenpuffer	
10 x TBE	0,5 x
Harnstoff	8 M
XCFF	0,03 % (w/v)
BPB	0,03 % (w/v)

10 x TBE	
Tris	900 mM
H ₃ BO ₃	900 mM
Na ₂ EDTA	25 mM

3.2.4 Detektion von Nukleinsäuren im Gel

3.2.4.1 Lokalisierung durch Fluoreszenzlöschung

Größere Mengen an Nukleinsäuren können zur schnellen Kontrolle in Gelen durch Absorption von UV-Licht lokalisiert werden. Dazu wird das auf einer UV-durchlässigen Kunststoffplatte oder Haushaltsfolie liegende Gel auf eine Dünnschichtplatte mit

Fluoreszenzindikator positioniert und mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) von oben direkt bestrahlt. Nukleinsäure-Mengen ab etwa 1 µg werden als blaugraue Schatten dargestellt, da sie bei dieser Wellenlänge UV-Licht absorbieren. Diese Methode funktioniert aber nur bei Polyacrylamidgelen geringer Dicke (max. 0,5 mm), da auch Polyacrylamid die Fluoreszenz absorbiert.

3.2.4.2 Lokalisierung durch Toluidinblaufärbung

Toluidinblau ist ein kationischer Farbstoff, der sich an Nukleinsäuren anlagert und diese nach Gelentfärbung sichtbar macht. Die Nachweisgrenze liegt bei 50-100 ng. Zur Anfärbung wird das Polyacrylamidgel von beiden Glasplatten getrennt und in einer Färbelösung ca. 10 min vorsichtig geschüttelt. Die Färbelösung wird abgegossen und das Gel mit einer Entfärbelösung, die mehrmals gewechselt wird, überschichtet. Das Gel wird solange entfärbt, bis die Nukleinsäurebanden deutlich sichtbar werden und die Hintergrundfärbung nahezu verschwunden ist. Das gefärbte Gel kann im weißen Durchlicht fotografiert werden. Bei präparativen PAA-Gelen werden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die Nukleinsäuren eluiert (3.2.6).

Toluidin-Färbelösung		Toluidin-Entfärber	
Toluidinblau	0,4 % (w/v)	Methanol	35 % (v/v)
Methanol	45 % (v/v)	Essigsäure	1 % (v/v)
Essigsäure	1 % (v/v)		

3.2.4.3 Lokalisierung durch Färbung mit Ethidiumbromid

Der rötliche Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid lagert sich, bedingt durch die planare Struktur, zwischen die Basenpaare doppelsträngiger Nukleinsäuren ein. Dabei interkalieren die Aromaten-Ringe der Verbindung an die heterozyklischen Nukleobasen. Doppelstrang-DNA wird besonders intensiv gefärbt, auch Einzelstrang-DNA und RNAs reagieren aufgrund von im nativen Zustand vorhandenen Sekundärstrukturen. Bei denaturiert vorliegenden Nukleinsäuren wird die Fluoreszenz minimiert.

Ethidiumbromid kann dem Gel- bzw. Laufpuffer von Agarosegelen (3.2.1) direkt zugegeben werden, alternativ können Gele nach der elektrophoretischen Auftrennung für etwa 15 min in einem Ethidiumbromid-Bad (Endkonzentration 0,5 µg/ml) nachgefärbt werden. Die Detektion erfolgt durch Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm). Die Nachweisgrenze liegt für Doppelstrang-DNA bei etwa 5 ng, für denaturierte RNA erheblich darüber.

3.2.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für enzymatische Reaktionen werden häufig hochreine DNA-Fragmente benötigt. Daher ist es notwendig, die DNA über ein Agarosegel aufzutrennen. Nach der Elektrophorese wird die gewünschte Bande ausgeschnitten und aus dem Gel zurückgewonnen. Dazu wird das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Im ersten Schritt wird die Agarose mit der DNA durch ein starkes denaturierendes Agens (Guanidiniumhydrochlorid) in Lösung gebracht. Unter hoher Salzkonzentration wird die DNA an eine Silica-Matrix gebunden. Nach Waschen mit 70 % Ethanol wird die reine DNA mit Niedrigsalzpuffer (TE-Puffer, pH 8) eluiert.

3.2.6 Elution von Nukleinsäuren aus denaturierenden Polyacrylamidgelen

Die zu eluierende Nukleinsäureprobe wird durch Fluoreszenzlöschung (3.2.4.1), Toluidinfärbung (3.2.4.2) oder Autoradiografie im Gel sichtbar gemacht. Die gewünschte Bande wird ausgeschnitten und in kleinere Stücke zerteilt. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß werden die Gelstücke mit Elutionspuffer bedeckt. Zum Aufbrechen der Gelstücke wird die Probe bei -80 °C eingefroren, um die Gelmatrix poröser zu machen. Zur Rückgewinnung der Nukleinsäure werden die Gelstücke aufgetaut und über Nacht eluiert (IKA-Vibrax-VXR, 1400 U/min). Der Überstand wird abgenommen und die Gelstücke nochmals mit einer geeigneten Menge Elutionspuffer über Nacht eluiert. Die Überstände werden vereinigt und die enthaltene DNA bzw. RNA präzipitiert (3.1.1). Alternativ können kurze Oligonukleotide bis 25 Bp mit TE-Puffer eluiert werden, wenn sie für Hybridisierungen verwendet werden. Eine Ethanolpräzipitation ist in diesem Fall nicht notwendig.

Elutionspuffer	
Tris-HCl, pH 7,5	500 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
SDS	0,1 % (w/v)

3.3 Nukleinsäure-Amplifizierung

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis (Saiki et al., 1985) kann genutzt werden, um DNA zu isolieren und zu modifizieren. Letzteres geschieht dabei mit Hilfe von modifizierten Primern oder Nukleotiden, die entweder Sequenzänderungen oder Basenmodifikationen einfügen. Mit Hilfe einer thermostabilen, prokaryotischen Polymerase (aus *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus* oder *Pyrococcus furiosus*) wird die Ziel-DNA

in mehreren Zyklen exponentiell vervielfältigt. In jedem Zyklus werden zuerst die beiden komplementären Stränge der DNA-Doppelhelix durch Hitzedenaturierung getrennt. Im nächsten Schritt werden die Primer bei einer niedrigeren Temperatur an die 5'-Enden hybridisiert, so dass die komplementären Stränge im letzten Schritt durch die Polymerase synthetisiert werden können.

Die hier verwendete *Pfu*-Polymerase hat den Vorteil, dass sie trotz hoher Prozessivität nur wenige Mutationen in die amplifizierte DNA einfügt. Das liegt an der vorhandenen *proofreading*-Aktivität (3'→5' Exonukleaseaktivität), die zur Korrektur falscher Nukleotidinkorporation führt.

PCR-Reaktionsansatz		Reaktionszyklen		
DNA-Matrize	10-100 pg	94 °C	2 min	1 x
Primer 1, 2 (10 µM)	je 0,3 µl	94 °C	30 sek	25-30 x
dNTP (2 mM)	2 µl	T _m -3 °C	30 sek	
10 x Puffer	2 µl	72 °C	1 min/kB* 2 min/kB [#]	
<i>Taq</i> */ <i>Pfu</i> [#] DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	72 °C	5 min	1 x
ddH ₂ O	ad 20 µl	4 °C	∞	

* Parameter für *Taq*-Polymerase, [#] Parameter für *Pfu*-Polymerase

3.3.2 Kolonie-PCR

Ein einfacher und schneller Nachweis, ob ein Bakterienklon einen Vektor mit dem gewünschten Insert enthält, bietet neben der Blau-Weiß-Selektion die Kolonie-PCR. Dabei wird gleichzeitig die Orientierung und Identität des Inserts überprüft. Anstatt reine DNA als Matrize zu verwenden, wird eine Kolonie mit der Pipettenspitze aufgenommen und in 5 µl H₂O resuspendiert. Durch Erhitzen bei 95 °C für 5 min werden die Zellen lysiert und alle enthaltenen Enzyme inaktiviert. Zu dem Lysat wird der PCR-Mastermix mit den Primern, dNTPs, 10 x Reaktionspuffer und hitzestabiler Polymerase gegeben und die PCR unter den spezifischen Bedingungen durchgeführt.

3.3.3 Mutagenese von DNA mittels der *QuikChange*-Strategie

Diese Mutagenese-Variante des *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) wird eingesetzt, um Punktmutationen sowie Insertionen und Deletionen in DNA während einer PCR einzufügen. Die zu mutierende DNA muss in einem Plasmid vorliegen, das aus einem methylierungsfähigen Stamm (z.B. DH5α) isoliert wurde. Zur Mutagenese werden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide konstruiert, die die gewünschte Mutation

tragen und an beide Stränge des Plasmides hybridisieren können. Während der PCR (3.3.1) werden beide Stränge des Plasmides mit den Mutationen neusynthetisiert. Für die Reaktion wird eine Polymerase mit "proofreading"-Aktivität (z.B. *Pfu*-Polymerase) verwendet, um keine unbeabsichtigten Mutationen einzufügen. Als Produkt der PCR entsteht ein Plasmid, das sogenannte "nicks" aufweist. Um die mutierte DNA von der Matrize zu isolieren, wird das Ausgangsplasmid mit DpnI hydrolysiert (3.5.1). Diese Restriktionsendonuklease erkennt und spaltet methylierte DNA. Die in der PCR generierte DNA ist nicht methyliert und bleibt unversehrt. Die folgende Transformation eines kompetenten *E. coli*-Stammes (z.B. DH5 α) mit dem DpnI-behandelten PCR-Produkt ermöglicht die Isolierung des kompletten ringförmigen mutierten Plasmides in großen Mengen.

3.3.4 Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungen wurden von der Core-Unit des IZKF in Leipzig sowie von SeqLab in Göttingen nach der Kettenabbruchmethode (Sanger und Coulson, 1975) durchgeführt. Dazu wurde das BigDye 3.0 Kit verwendet und die Produkte auf einem ABI Prism 3100 Sequencer bzw. 3730 DNA Analyzer analysiert. Pro Reaktion wurde je 0,6-1 μ g Plasmid DNA eingesetzt.

3.3.5 Berechnung der Schmelztemperatur von DNA

Die Bestimmung der Schmelztemperatur (T_m) kurzer DNA wie z.B. Primer erfolgt nach Wallace et al., 1979 (Gleichung 1). Für DNA, die länger als 25 Bp ist, wird die Schmelztemperatur in Abhängigkeit des GC-Gehaltes und der Salzkonzentration entsprechend Gleichung (2) (Meinkoth und Wahl, 1984) berechnet. In einer PCR wurde die Hybridisierungstemperatur ca. 3 °C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur eingestellt.

$$(1) \quad T_m = 2 (A + T) + 4 (G + C)$$

$$(2) \quad T_m = 85,5 + 16,6 * (\log Na^+) - 0,41 * (\% GC) - 675/\text{Gesamtlänge}$$

3.4 Analyse von RNA

Im Umgang mit RNA ist darauf zu achten, die Proben nicht mit RNasen zu kontaminieren. Dazu werden alle Arbeiten mit Einweghandschuhen durchgeführt. Die zu verwendenden Glaswaren werden 3 h bei 180 °C gebacken. Lösungsmittel werden mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (DEPC-H₂O) angesetzt und wenn möglich autoklaviert.

3.4.1 Herstellung von RNase-freiem Wasser mit DEPC

RNasen sind häufig resistent gegen Denaturierung durch Hitze oder Detergenzien und deshalb schwer inaktivierbar. Zur irreversiblen Inhibierung vieler RNasen kann DEPC verwendet werden. DEPC bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine und damit auch an die für die katalytische Funktion wichtigen His-Seitenketten im katalytischen Zentrum vieler RNasen. Da DEPC als Ethylierungsmittel kanzerogene Eigenschaften besitzt, werden alle Arbeiten unter einem Abzug ausgeführt. DEPC wird in einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) mit 1 L ddH₂O bei geöffnetem Schraubverschluss über Nacht gerührt. Nach entsprechender Verteilung in Aliquots wird abschließend autoklaviert (40 min, 120 °C, 2 bar), um überschüssiges DEPC zu hydrolysieren.

3.4.2 Identifizierung von Nukleinsäuren durch Hybridisierung

In einem Nukleinsäure-Gemisch können einzelne Spezies durch Immobilisierung auf einer Membran und anschließender Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde nachgewiesen werden. Die Nukleinsäuren werden zuerst in einem denaturierenden Agarosegel oder Polyacrylamidgel der Größe nach fraktioniert und dann auf eine Membran übertragen und fixiert (Southern-/Northern Blot). Unfraktionierte Nukleinsäuren können durch punktförmiges Auftragen (Dot-Blot) auf solch einer Membran immobilisiert werden. Anschließend erfolgt die Hybridisierung mit der Sonde, sowie die Detektion durch eine Farbreaktion (NBT/BCIP) oder dem Nachweis von Radioaktivität.

3.4.2.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Für die radioaktive Phosphorylierung werden nur über HPLC oder PAA-Gel gereinigte Oligonukleotide verwendet. Der Reaktionsansatz wird 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch Hitzedenaturierung bei 70 °C für 10 min. Die eingesetzten Mengen entsprechen einem molaren Verhältnis von 13,3 pmol [γ -³²P]-ATP zu 12,5 pmol Oligonukleotid, um eine quantitative Markierung zu gewährleisten. Um nicht eingebautes [γ -³²P]-ATP zu entfernen, muss der Reaktionsansatz nach der Inkubation gereinigt werden. Hierzu wird das Reaktionsgemisch auf einem denaturierenden 15 % PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.3). Der Reaktionsansatz wird mit eingetrocknetem Harnstoff-Probenpuffer gemischt, durch Erhitzen denaturiert (2 min, 94 °C) und die gesamte Probe direkt in eine Probentasche eines Gels mit den Maßen 20 x 20 x 0,045 cm aufgetragen. Die Elektrophorese wird mit 600 V bei maximal 20 W durchgeführt, bis das Bromphenolblau des Probenpuffers den unteren Gelrand erreicht hat. Nun wird eine Glasplatte abgenommen, das Gel mit Haushaltsfolie bedeckt und Fluoreszenzmarker angebracht. Durch Autoradio-

grafie (mind. 1/2 h) wird das markierte Oligodesoxyribonukleotid lokalisiert, anschließend ausgeschnitten und über Nacht mit TE-Puffer eluiert (3.2.6).

5'-Markierungsreaktion		Volumen
DNA-Oligonukleotid	1,25 mM	1,25 µl
[γ - ³² P]-ATP (3000 Ci/mmol; 10 µCi/µl)	4 µCi/µl	4 µl
10 x PNK-Puffer	1 x	1 µl
T4-PNK (10 U/µl)	0,5 U/µl	0,5 µl
ddH ₂ O	3,25 µl	

3.4.2.2 Dot-Blot von RNA

Für die Hybridisierung einer Sonde mit der Ziel-RNA muss diese zunächst auf einer Membran (Nitrozellulose, Nylon) fixiert werden. Die RNA wird für 3 min bei 65 °C denaturiert und anschließend im Eis abgekühlt. Je 1 µl verschiedener Verdünnungen der RNA werden auf die Membran pipettiert. Durch Backen der Membran bei 120 °C für 1/2 h (alternativ 80 °C für 1 h) wird die RNA irreversibel auf der Membran verankert. Hybridisierung und Detektion erfolgen wie unter (3.4.2.5) beschrieben.

3.4.2.3 Kapillar-Transfer von RNA auf eine Membran (Northern Blot)

Mit dieser für DNA entwickelten Methode (Southern, 1975) werden hier RNA-Moleküle aus einem denaturierenden Agarosegel (3.2.2) durch Kapillarkräfte auf eine Membran übertragen. Durch Auflegen mehrerer Lagen Papiertücher auf den Blot-Stapel (Abb. 16) wird der Transferpuffer seinem Konzentrationsgradienten folgend nach oben gesaugt und die RNA aus dem Gel zur Membran transportiert und von ihr gebunden. Ist die Nukleinsäure einmal fixiert, kann der Blot mehrere Monate bei 4 °C aufbewahrt werden.

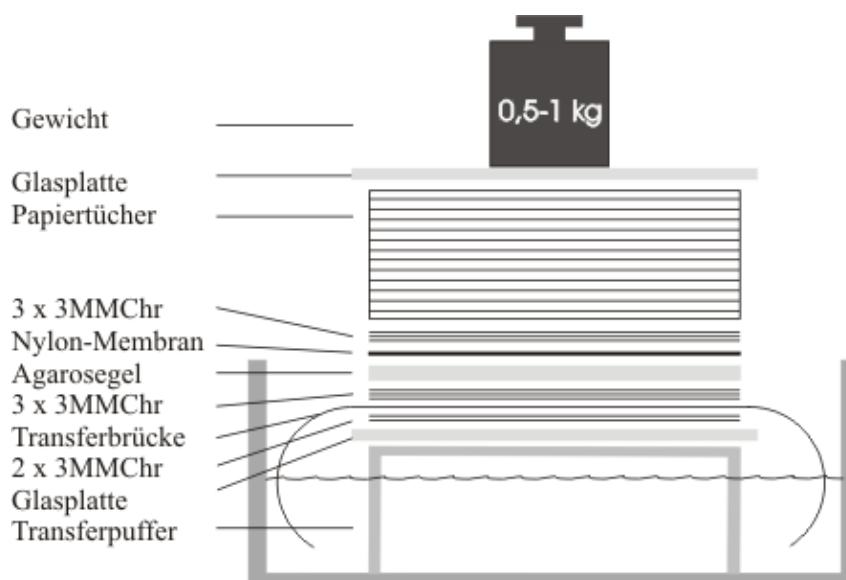


Abb. 16: Aufbau des Kapillarblots nach Southern

Zuerst wird die RNA in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht dokumentiert. Um das Formaldehyd zu entfernen, das die Übertragung der RNA auf die Membran verringert, wird das Gel zweimal für 10 min in DEPC-H₂O gewaschen. Der als Transferbrücke dienende lange Streifen Filterpapier wird in 10 x SSC-Puffer getränkt, auf eine mit zwei 3MM Chr-Papieren bedeckte Glasplatte über dem 10 x SSC-Flüssigkeitsspiegel gelegt und zu beiden Seiten in das Reservoir aus 10 x SSC-Puffer getaucht. Der weitere Aufbau der Kapillar-Blotapparatur erfolgt nach Abb. 16. Der Blotvorgang dauert ca. 20 h. Danach wird die Membran entnommen, kurz mit 10 x SSC gespült und an der Luft getrocknet. Durch Backen der Membran bei 120 °C für 1/2 h wird die RNA irreversibel auf der Membran verankert. Hybridisierung und Detektion erfolgen wie unter (3.4.2.5) beschrieben.

10 x SSC		Einwaage
NaCl	1,5 M	87,5 g/l
Na ₃ -Citrat•2 H ₂ O	0,3 M	44 g/l
pH 7 mit HCl		

3.4.2.4 Elektrophoretischer Transfer von RNA auf eine Membran

Die Analyse kleiner RNAs durch Hybridisierung benötigt ein engmaschiges Polyacrylamidgel zur Auftrennung. Da der Kapillartransfer bei Polyacrylamidgelen nicht erfolgreich ist, wird für diese Art der Gele der Elektroblot im Tanksystem mit einer BioRad-Apparatur durchgeführt. Kleine RNAs werden über ein denaturierendes 8 % PAA-Gel (20 x 20 x 0,04 cm; 3.2.3) aufgetrennt, da einzelsträngige RNA zu Sekundärstrukturbildung neigt. Nach

beendeter Elektrophorese wird das Gel in 0,5 x TAE-Lösung mit 1 µg/ml EtBr für 10 min äquilibriert. Dieser Schritt dient neben der Anfärbung der Nukleinsäuren auch zur Entfernung des Harnstoffs, da dieser den Blotprozess behindert. Das Gel wird unter UV-Licht fotografiert. Zur Abstandsbestimmung wird dabei ein fluoreszierendes Lineal angelegt. Inzwischen wird eine Nylon-Blotmembran (Zeta-Probe, Bio-Rad) mit den Maßen des Gels und zwei 3MM Chr-Filterpapieren in Blotpuffer eingeweicht. Das Blotsandwich wird wie in Abb. 17 luftblasenfrei zusammengebaut und in die Blotkammer mit eiskaltem 0,5 x TAE eingespannt (Gel kathodenseitig, Membran anodenseitig). Der Transfer wird unter Kühlung 1/2-1 h bei 80 V (max. 1 A) durchgeführt. Anschließend werden Gel und Membran unter UV-Licht aufgenommen. Die Membran wird nun kurz mit Puffer gespült und bei 80 °C für 1 h gebacken, um die Nukleinsäuren zu fixieren. Bis zur Hybridisierung kann die Membran trocken bei 4 °C aufbewahrt werden.

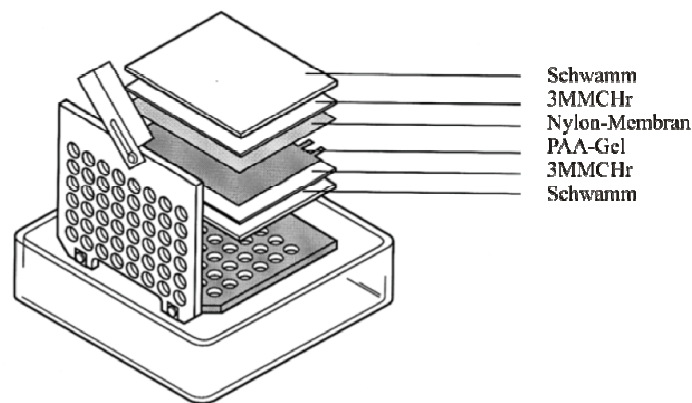


Abb. 17: Aufbau eines Tank-Blot Sandwiches für die Trans Blot Mini Cell

Die Darstellung wurde dem BioRad-Handbuch für die Trans Blot Mini Cell entnommen.

3.4.2.5 Hybridisierung einer Membran mit einer radioaktiven ssDNA-Sonde

Die trockene Membran wird vor der Prozedur mit ddH₂O benetzt und in einem passenden Gefäß (Glas- oder Falcon-Röhrchen, verschließbare Kunststoffdose, Folienschlauch) mit reichlich Hybridisierungspuffer mindestens 30 min bei 50-65 °C unter vorsichtigem Schütteln vorhybridisiert. Der benutzte Vorhybridisierungspuffer wird verworfen und frischer vorgewärmter Hybridisierungspuffer zugegeben, so dass die Membran gerade bedeckt ist (ca. 50 µl/cm²). Jetzt wird die radioaktiv markierte Sonde (3.4.2.1) zugegeben (300000 cpm/ml Puffer) und 30-60 min bei (T_m-10 °C) hybridisiert. Die benutzte Hybridisierungslösung wird vorsichtig entfernt und zur eventuellen Wiederverwendung eingefroren.

Um das Hintergrundsignal zu minimieren, wird die Membran zwei- bis dreimal für 5 min mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei RT gewaschen, bis ein konkretes Signal lokalisiert werden kann

(Geigerzähler-Kontrolle mit möglichst kleinem Sondendurchmesser). Sollte das Signal noch über die ganze Membran verteilt sein, wird die Waschtemperatur in 5 °C-Schritten bis maximal 10 °C unter die berechnete Hybridisierungstemperatur erhöht. Die Lösung wird nun vollständig entfernt und mit Filterpapier (Whatman 1MM) trockengetupft. Mit Haushaltsfolie abgedeckt kann sie exponiert werden.

Für eine Wiederverwendung der Membran kann die Sonde durch schütteln der Membran in Waschlösung bei 90 °C für 5-10 min entfernt werden. Mit dieser Behandlung kann die Membran ohne einen Verlust der Signale bis zu dreimal hybridisiert werden.

Hybridisierlösung		Vorhybridisierlösung	
SSC	5 x	SSC	5 x
Na-Phosphat	20 mM	Na-Phosphat	20 mM
SDS	0,1 % (w/v)	SDS	0,1 % (w/v)
Denhardt's	1 x	Denhardt's	1 x
50 x Denhardt's		Lachs-DNA	100 µg/ml
Ficoll 40	5 % (w/v)		
Polyvinylpyrrolidon	5 % (w/v)		
BSA	5 % (w/v)		

3.4.2.6 Quantifizierung von Gelbanden/ Bestimmung von Bindungskonstanten

Zur Analyse von Gelbanden wurde die Software AlphaEaseFC (Biozym) verwendet. Mit dieser Software wird die Pixelzahl einer markierten Fläche ausgezählt. Diese werden in das Verhältnis zur Kontrollprobe gesetzt und der Anteil gebundener und nicht gebundener RNA ermittelt.

Das Gleichgewicht einer einfachen Bindungsreaktion zwischen zwei Molekülen (Protein und Ligand bzw. RNA) wird durch Gleichung (1) dargestellt:

$$1) \quad k_s = \frac{c_{p0} \cdot c_L}{c_{PL}}$$

c_{PL} = Konzentration des Protein-Ligand-Komplex

c_{p0} = Gesamtproteinkonzentration

c_L = Gesamtligandenkonzentration

Bei Konstanthaltung der Proteinkonzentration und Variation der RNA-Konzentration im Bindungsversuch kann man den gebundenen und freien Anteil des Liganden bestimmen. In diesen Versuchen werden beide Bindungspartner in vergleichbaren Mengen eingesetzt. Die Gesamtmenge des Liganden wird durch den gebundenen Teil reduziert.

Aus der allgemeinen Bindungsgleichung

$$2) \quad C_{PL} = \frac{C_{P0} \cdot C_L}{k_s + C_L}$$

erhält man durch umformen die doppelt reziproke Form der Gleichung nach Klotz (3). Bei Auftragung $\frac{1}{R}$ gegen $\frac{1}{C_L}$ wird eine Gerade mit der Steigung $\frac{k_s}{n}$ erhalten, die die Ordinate bei $\frac{1}{n}$ und die Abszisse bei $-\frac{1}{k_s}$ schneidet. Durch die Komprimierung der Werte im hohen Konzentrationsbereich ist bei der doppelt reziproken Auftragung die exakte Bestimmung von n schwierig. Eine geringfügige Fehlerabweichung bei geringen Ligandenkonzentrationen kann hier den Verlauf der Regressionsgeraden erheblich beeinträchtigen. Alle Geraden einer Protein-Ligand-Bindungsbeziehung treffen sich in einem gemeinsamen Ordinaten-schnittpunkt.

$$3) \quad \frac{C_{P0}}{C_{PL}} = \frac{k_s}{n} \cdot \frac{1}{C_L} + \frac{1}{n} \quad \text{bzw.} \quad \frac{1}{R} = \frac{k_s}{n} \cdot \frac{1}{C_L} + \frac{1}{n}$$

$$R = \frac{C_{PL}}{C_{P0}}$$

Durch Multiplikation der Gleichung (3) mit $\frac{R \cdot n}{k_s}$ erhält man die Beziehung nach Scatchard (4). Hier wird R gegen $\frac{R}{C_L}$ aufgetragen die eine Gerade mit der Steigung $-\frac{1}{k_s}$ ergibt, die die Ordinate bei $\frac{n}{k_s}$ und die Abszisse bei n schneidet. Die Geraden einer Protein-Ligand-Bindungsbeziehung treffen sich in einem gemeinsamen Abszissenschnittpunkt.

$$4) \quad \frac{C_{PL}}{C_{P0}} = -k_s \cdot \frac{C_{PL}}{C_{P0} \cdot C_L} + n \quad \text{bzw.} \quad R = -k_s \cdot \frac{R}{C_L} + n \quad \text{bzw.} \quad \frac{R}{C_L} = \frac{n}{k_s} - \frac{R}{k_s}$$

Durch Multiplikation der Gleichung (3) mit C_L erhält man die Darstellungsform nach Hanes (5), bei der C_L gegen $\frac{C_L}{R}$ aufgetragen wird. Die Zahl der Bindungsstellen n wird aus der Steigung $\frac{1}{n}$ oder zusammen mit k_s aus dem Ordinatenabschnitt $\frac{k_s}{n}$ entnommen. Ein Fehler in der Bestimmung der einen Konstante überträgt sich auch auf die andere. Insgesamt ist die Fehlerverzerrung geringer als bei den beiden anderen Gleichungen.

$$5) \quad \frac{C_L}{R} = \frac{C_L}{n} + \frac{k_s}{n}$$

3.4.3 Herstellung von cDNA

Für die RNA-Analyse wird diese oft in DNA transkribiert. Besonders für die Bestimmung der nativen 5'-Enden von RNA ist es von Vorteil, eine Reverse Transkriptase (RTase) zu verwenden, die keine RNase H-Aktivität besitzt (M-MuLV). Dadurch wird die RNA im RNA/DNA-Duplex nicht degradiert. Die verlängerte Lebensdauer des Duplex ermöglicht es,

lange cDNA-Moleküle herzustellen. Für die Herstellung von cDNAs aus strukturierten RNAs wie z.B. RNase P/MRP RNA wird die AMV-RTase bevorzugt, da sie auch bei höheren Temperaturen eine ausgezeichnete Stabilität und Prozessivität besitzt. Nach beendeter DNA-Polymerisation wird die RNA durch RNase H zerstört. Alle Enzyme des Reaktionsansatzes werden bei 70 °C für 10 min inaktiviert. Die resultierende einzelsträngige cDNA wird über Microconsäulen gereinigt (3.1.2), um Nebenreaktionen mit den überschüssigen Primern oder Störeffekte durch die enthaltenen Salze zu verhindern.

Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese		Volumen/Menge
RNA bzw. mRNA	4-400 ng/μl	1-10 μg bzw. 0,1-1 μg
d(T) _n -Primer (10 μM)	1,3 μM	3,3 μl
ddH ₂ O		ad 15 μl
5 min, 70 °C, im Eisbad abkühlen		
5 x Reaktionspuffer	1 x	5 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0,8 U/μl	0,5 μl
dNTP (10 mM)	1 mM	2,5 μl
M-MuLV (RNase H ⁻ , 200 U/μl) bzw. AMV (10 U/μl)	8 bzw. 1,2 U/μl	1 μl bzw. 3 μl
ddH ₂ O		ad 25 μl
1 h, 42-55 °C		
RNase H (1 U/μl)	0,04 U/μl	1 μl
1 h, 37 °C		
15 min, 70 °C		

3.4.4 Bestimmung von RNA-Enden

3.4.4.1 Polyadenylierung von RNA

Um eine cDNA aus nichtpolyadenylierter RNA mit Oligo(dT)-Primern herzustellen, werden zunächst die 3'-Enden der RNAs *in vitro* polyadenyliert. Dazu wird die Poly(A)-Polymerase aus *E. coli* (NEB) verwendet. Vor der Reaktion wird die RNA 5 min bei 65 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Der Reaktionsansatz wird nach beendeter Reaktion mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) gereinigt und kann für die cDNA-Synthese verwendet werden.

Polyadenylierung von RNA	
RNA	10μg
10 x Puffer	2μl
ATP (10mM)	2μl
<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase (5U/μl)	1μl
ddH ₂ O	ad 20μl
10 min 37°C	

3.4.4.2 Bestimmung der 3'-Enden von RNA

Diese im Folgenden als RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) bezeichnete Methode eignet sich, um sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende von RNA-Transkripten zu bestimmen (Abb. 18). Die RACE-PCR entspricht dem Prinzip einer „*nested PCR*“, die im Verlauf eine höhere Spezifität erreicht, indem mehrere genspezifische Primerpaare im Reaktionsansatz verwendet werden. Der Unterschied ist, dass bei der RACE-PCR nur ein genspezifischer Primer an Stelle eines Primerpaares ersetzt wird. Der zweite Primer bindet an einer Adaptersequenz am 3'-Ende des PolyA. Die Produkte können nach jeder PCR gereinigt werden, um Nebenreaktionen zu verhindern.

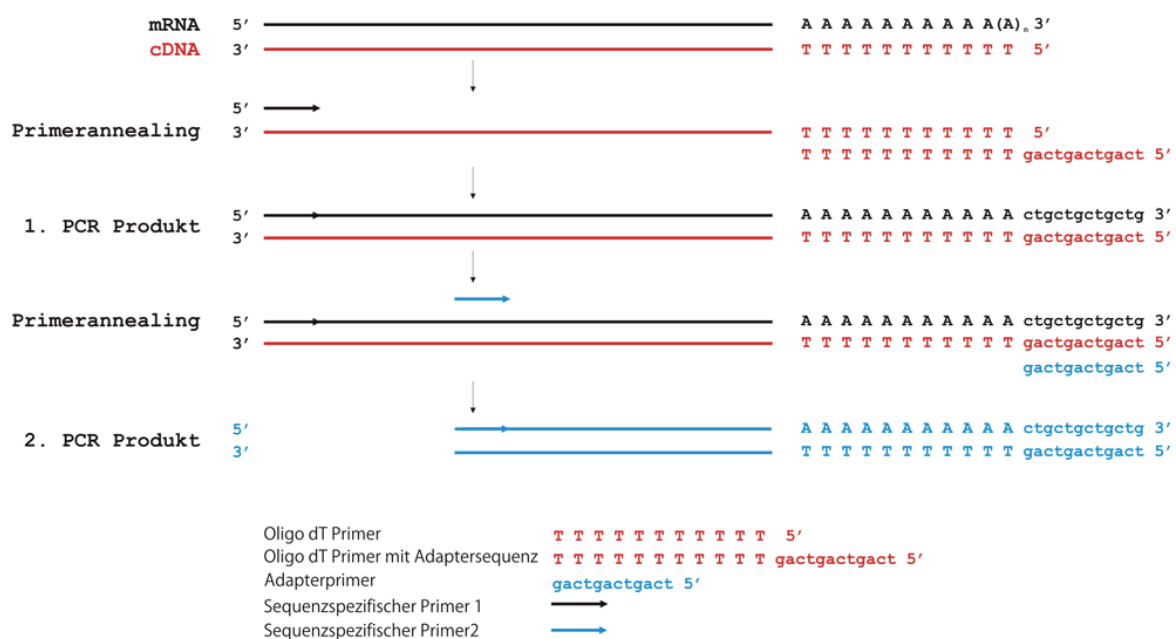


Abb. 18: Schema der 3'-RACE-PCR, Sequenzen sind beispielhaft

Im ersten Schritt der RACE wird Poly(A)⁺-RNA mit Hilfe von d(T)-Oligonukleotidprimern revers transkribiert. In der folgenden PCR wird ein Produkt mit einem genspezifischem *sense* Primer 1 und einem *antisense* d(T)₁₆-Adapter Oligomer aus der cDNA amplifiziert. Die mittels PCR Purification Kit (Roche) gereinigten PCR-Produkte werden in einer weiteren PCR mit einem genspezifischen *sense* Primer 2, der stromabwärts der ersten Primerbindungsstelle hybridisiert, und einem Adapterprimer amplifiziert, um daraus kürzere und spezifischere Produkte zu generieren. Dieser Prozess kann nacheinander mit mehreren Primerpaaren durchgeführt werden, bis die gewünschte Spezifität erreicht ist. Das Produkt dieser letzten Amplifikation wird im Agarosegel beurteilt, ausgeschnitten und eluiert (3.2.5). Das so gereinigte Fragment wird anschließend in pCRII-TOPO ligiert und sequenziert.

3.4.4.3 Bestimmung der 5'-Enden von RNA

Für die 5'-RACE kann die cDNA mit einem genspezifischen Primer oder mittels Hexamer-Zufallsprimern so dargestellt werden, dass kein Poly(A)_n in Poly(T)_m überschrieben wird. Die synthetisierte cDNA wird über ein PCR Purification Kit gereinigt und am 3'-Ende durch die Terminale Transferase (Roche) modifiziert. Diese synthetisiert in Abhängigkeit vom verfügbaren Nukleotidpool ein kurzes Homopolymer an das 3'-Ende der cDNA, das dem 5'-Ende der RNA-Transkripte entspricht. In dieser Arbeit wurde an Stelle von dATP auch dCTP eingesetzt, um statt polyadenylierte polycytidylierte cDNA herzustellen. Nun kann wie bei der 3'-RACE mit einem d(T)₁₆- bzw. d(GGIG)₃-Adapterprimer und einem genspezifischen *antisense* Primer die erste PCR durchgeführt werden. Weitere Amplifizierungen werden mit dem Adapterprimer und weiteren genspezifischen *antisense* Primern, die näher zum 5'-Ende paaren, durchgeführt. Das Produkt dieser Amplifikation wird im Agarosegel beurteilt, ausgeschnitten und eluiert (3.2.5). Das gereinigte Fragment wird in pCRII-TOPO ligiert und sequenziert.

Polyadenylierung/Polycytidylierung von cDNA		Volumen
cDNA		19 µl
dATP bzw. dCTP (2 mM)	0,2 mM	2,5 µl
10 x Reaktionspuffer	1 x	2,5 µl
3min, 95 °C, Eisbad		
Terminale Transferase (40 U/µl)	1,6 U/µl	1 µl
25 min, 37 °C; 10 min, 70 °C		

3.5 Klonierung von DNA

3.5.1 Enzymatische Hydrolyse von DNA

Ein wichtiges Mittel zur Präparation und Analyse von DNA ist die Restriktionshydrolyse. Hierbei werden Typ-II Restriktionsendonukleasen verwendet, die charakteristische Enden in doppelsträngiger DNA erzeugen. Die meisten in der Molekularbiologie verwendeten Enzyme dieses Typs erkennen 4-8 nt lange Palindromsequenzen und schneiden diese symmetrisch oder asymmetrisch. Dabei entstehen glatte Enden (*blunt ends*) bzw. 3'- oder 5'-überhängende Enden (*kohäsive* oder *sticky ends*). Die Temperatur, die Dauer sowie der Reaktionspuffer sind vom verwendeten Enzym abhängig und richten sich nach Herstellerangaben. Die Qualität der Hydrolyse wird über ein Agarosegel analysiert. Ein Längenstandard, eine Kontrollhydrolyse und eine nicht hydrolysierte DNA-Probe werden zum Vergleich ebenfalls aufgetragen.

3.5.2 Dephosphorylierung von DNA

Um die Rezirkularisierung eines durch Restriktionshydrolyse linearisierten Vektors in einer Ligationsreaktion zu verhindern, muss dieser an seinen 5'-Enden dephosphoryliert werden. Zum Abspalten der 5'-Phosphatgruppe wird alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = *calf intestinal alkaline phosphatase*) verwendet. Für die Dephosphorylierung wird der Restriktionsansatz über ein Gel aufgetrennt und daraus eluiert (3.2.5).

Dephosphorylierung von DNA		Volumen/Menge
linearisierter Vektor	0,3 µg/µl	10 µg
10 x Reaktionspuffer	1 x	3 µl
CIP (1 U/µl)	0,03 U/µl	1 µl
ddH ₂ O		ad 30 µl

Die Reaktion wird zweimal 30 min bei 37 °C inkubiert, wobei nach den ersten 30 min ein weiteres Aliquot CIP zugegeben wird. Nach beendeter Reaktion wird das Enzym durch Zugabe von Nitrilotriessigsäure-Lösung (NTA) bis zu einer Endkonzentration von 10 mM gestoppt und für 15 min bei 68 °C inkubiert. NTA ist in der Lage, das Zn²⁺-Ion im katalytischen Zentrum des Enzyms zu chelatisieren, so dass das Enzym gehemmt wird. Alternativ zur CIP kann SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) verwendet werden, die durch Hitzeinkubation (10 min, 70 °C) inaktiviert werden kann. Nach der Dephosphorylierung werden die Nukleinsäuren gefällt (3.1.1) und in TE-Puffer resuspendiert.

3.5.3 Phosphorylierung von DNA

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden ohne ein Phosphat an ihrem 5'-Ende synthetisiert. Deshalb müssen alle zu klonierenden PCR-Produkte an ihrem 5'-Ende phosphoryliert werden, um eine erfolgreiche Ligation mit einem Vektor durchführen zu können. Dazu wird T4-Polynukleotidkinase verwendet, die die γ-Phosphatgruppe von ATP hydrolysiert und auf die Nukleinsäurekette überträgt.

Für die Reaktion wird ein PCR-Produkt elektrophoretisch gereinigt (3.2.5) und mit Reaktionspuffer versetzt. Nach Enzymzugabe wird der Reaktionsansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Nachdem das Enzym durch einen Hitzeschritt (10 min, 65 °C) inaktiviert wurde, wird die DNA präzipitiert und in TE-Puffer resuspendiert.

Phosphorylierung von DNA		Volumen/Menge
PCR-Produkt	5-500 ng/µl	0,1-10 µg
10 x Reaktionspuffer	1 x	2 µl
T4-PNK (10 U/µl)	0,5 U/µl	1 µl
ddH ₂ O		ad 20 µl

3.5.4 Ligation von DNA-Molekülen

3.5.4.1 Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase

Für die Verknüpfung von DNA wird in der Molekularbiologie die in jeder Zelle stattfindende Ligationsreaktion angewendet, bei der eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphat des einen und dem 3'-OH des anderen DNA-Moleküls geknüpft wird. Für diese energieabhängige Reaktion können *E. coli*-DNA-Ligase oder T4-DNA-Ligase verwendet werden. Anders als *E. coli*-DNA-Ligase, die NADH benötigt, verwendet die T4-DNA-Ligase ATP als Cosubstrat. Da die Reaktion thermodynamisch kontrolliert wird, kann die vollständige und erfolgreiche Ligation nur über den Zeitfaktor und die Konzentrationen der Substrate begünstigt werden. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert soll daher 1:10 betragen. Das Reaktionsvolumen wird so gering wie möglich gehalten, um hohe Konzentrationen und damit ein Aufeinandertreffen der Reaktionspartner zu gewährleisten. Der Zusatz von 5 % Polyethylenglycol kann die Ligation verbessern. Eine Ligationsreaktion wird für 1 h bei RT oder in speziellen Fällen 12-24 h bei 15 °C (je nach Hersteller) durchgeführt. Um eine Rezirkularisierung des leeren Vektors zu verhindern, wird dieser vor der Ligation dephosphoryliert (3.5.2). Für eine Ligation von *blunt end*-DNA wird der Reaktionsansatz 2 Tage bei 15 °C inkubiert.

Ligation von DNA		Volumen/Menge
PCR-Produkt	25 fmol/μl	0,5 pmol
linearisierter Vektor	2,5 fmol/μl	0,05 pmol
10 x Reaktionspuffer	1 x	2 μl
T4-DNA-Ligase (5 U/μl)	0,25 U/μl	1 μl
PEG 4000	5 % (v/v)	2 μl
ddH ₂ O		ad 20 μl

3.5.4.2 Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem TOPO TA Cloning Kit

Die TOPO-Klonierung hat den Vorteil, dass auch kleinste Mengen von DNA mit hoher Ausbeute in den Vektor eingebracht werden können. Voraussetzung ist ein überhängendes 3'-Adenin an dem zu klonierenden DNA-Abschnitt und ein 5'-OH. Für den 3'-Adenin-Überhang wird die PCR mit *Taq*-Polymerase durchgeführt. Wenn eine Polymerase mit *proofreading* Aktivität für die Amplifikation verwendet wurde, wird der Reaktionsansatz anschließend für 5 min bei 72 °C mit *Taq*-Polymerase inkubiert. Der verwendete Vektor ist über eine Phosphotyrosyl-Bindung kovalent mit einer Topoisomerase verknüpft und hat ein 5' überhängendes Thymin.

Die Ligation der Insert-DNA mit dem pCRII-TOPO Vektor und die anschließende Transformation von chemotransformationskompetenten TOP10 Zellen wird nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt.

3.5.5 Transformation von *E. coli* mit Fremd-DNA

3.5.5.1 Herstellung von chemokompetenten Zellen

Die Methode nach Chung *et al.* (1989) ist eine Methode der Transformation mit sehr guten Kompetenzwerten. Durch Behandlung mit DMSO werden die Zellwände von Bakterien für DNA durchlässig gemacht. Mit PEG und Mg^{2+} wird die Aufnahme der DNA in die Zellen unterstützt.

Ein Verdünnungsausstrich von *E. coli*-Stämmen wird 18-36 h bei 37 °C auf Selektionsplatten inkubiert; mit einer Kolonie werden 2 ml LB-Medium in Schraubdeckelröhrchen angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Mit 250 µl dieser Vorkultur werden anschließend 100 ml SOC-Medium in einem 2 L Kolben angeimpft und unter Schütteln (220 Upm) bis zu $OD_{600} = 0,5$ inkubiert (die Zellen befinden sich in der logarithmischen Wachstumsphase). Die Kultur wird 15 min ins Eisbad gestellt und anschließend zentrifugiert (10 min, 3200 x g, 4 °C). Das Sediment wird in 1/100 Volumen frischer, eisgekühlter TSS-Lösung (*transformation and storage solution*) suspendiert und in 100 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Zellen können sofort transformiert oder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt werden.

Zur Bestimmung der Kompetenzzahl werden die zu überprüfenden Zellen mit 50 pg pUC19 transformiert. Die Kompetenz der Bakterien errechnet sich aus der Anzahl der Klone pro µg DNA. Zellen mit guter Kompetenz ergeben 5×10^7 Kolonien pro µg DNA.

TSS [#]	
LB-Medium	
PEG 8000	10 % (w/v)
DMSO	5 % (v/v)
MgSO ₄	50 mM

[#] steril filtrieren, bei -20 °C lagern

SOC-Medium	
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
Bacto-Trypton	2 % (w/v)
Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
MgSO ₄ [*]	10 mM
MgCl ₂ [*]	10 mM
Glukose [*]	20 mM

^{*} sterilfiltrieren, nach dem Autoklavieren des Mediums zugeben

3.5.5.2 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Ein 100 µl-Aliquot kompetenter Zellen wird auf Eis aufgetaut, mit maximal 10 ng Plasmid-DNA bzw. 5-10 µl eines Ligationsansatzes vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 sec, 42 °C im Wasserbad) und 10 min auf Eis werden 900 µl SOC-Medium zugegeben und 1 h, 37 °C, 250 U/min geschüttelt. Dieser Schritt gibt den transformierten Bakterien Zeit, die für ihre jeweilige Antibiotikaresistenz verantwortlichen Enzyme zu exprimieren. Jeweils 10 % bzw. 90 % werden direkt bzw. nach Zentrifugation (5 min; 6500 x g) auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.6 Expression heterologer Proteine in *E. coli*

3.6.1 Überexpression im analytischen Maßstab

Alle überexprimierten Proteine wurden in dieser Arbeit in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS überexprimiert. Die optimalen Expressionsbedingungen (Medienzusammensetzung, IPTG-Konzentration, Kultivierungstemperatur und Kultivierungsdauer) wurden bereits beschrieben (Krehan, Diplomarbeit, 2004).

20 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Chloramphenicol, 2 % Glukose) werden mit einer gesättigten Vorkultur 1:20 inokuliert. Unter regelmäßiger, etwa halbstündiger Wachstumskontrolle lässt man die Kultur bis zu $OD_{600} = 0,5-0,6$ heranwachsen. Nach Entnahme einer Probe (1 ml) wird die Expression durch IPTG-Zugabe in einer Endkonzentration von 1 mM gestartet. Danach werden weitere Proben (je 1 ml) in definierten Zeitabständen entnommen, 5 min bei 6500 x g abzentrifugiert und das Sediment in 1/10 Volumen TE-Puffer resuspendiert. Zur Kontrolle der Expression werden je 10 µl dieser Suspension mit 10 µl 2 x SDS-Probenpuffer gemischt, 3 min gekocht und über ein Laemmli-Gel (3.7.1) mit anschließender Coomassie-Färbung (3.7.3.1) analysiert.

3.6.2 Überexpression im präparativen Maßstab

Mit einer Einzelkolonie einer frisch ausgestrichenen Bakterienkultur werden 5 ml LB-Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 37 °C, 220 U/min inkubiert. Aus dieser Vorkultur werden 500 ml Antibiotika-supplementiertes Medium (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Chloramphenicol, 2 % Glukose) in einem 2 L Erlenmeyerkolben inokuliert (1:1000). Unter Schütteln (220 U/min) wächst die Bakterienkultur bis zu einer $OD_{600} = 0,5-0,6$ und die Proteinexpression wird durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration 1 mM) induziert. Die Inkubation wird für 3-4 h Stunden bei 33 °C fortgesetzt. Die Zellen werden durch

Zentrifugation (20 min, 10000 x g, 4 °C) geerntet und gewogen. Dabei werden aus 500 ml Kultur etwa 2,5 g feuchte Zellmasse gewonnen. Das Zellsediment wird direkt weiterverarbeitet bzw. zur Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren. Zur Analyse auf Erfolg und Quantität der Expression werden vor IPTG-Zugabe und jede Stunde bis zur Zellernte jeweils 1 ml Kultur entnommen, sedimentiert und mit SDS-Proben-Puffer für ein Laemmli-Gel vorbereitet (3.7.1).

3.6.3 Allgemeine Methoden der Proteinbiochemie

Bei Arbeiten mit Proteinen werden autoklavierte Gefäße und Lösungen verwendet. Alle Lösungen werden mit PMSF (0,1 mM), Leupeptin (2 µM) und Pepstatin A (1 µM) versetzt. Die Lagerung von Proteinlösungen erfolgt bei 4 °C. Zur längerfristigen Aufbewahrung werden Proteinlösungen mit 20 % Glycerin bei -20 °C eingefroren.

3.6.3.1 Silanisieren von Gefäßen

Um Verluste durch Adsorptionseffekte an der Oberfläche von Glas- und Plastikgefäßen zu minimieren, werden diese silanisiert. Alle Arbeitsschritte werden unter dem Abzug durchgeführt, da Dichlordimethylsilan hochflüchtig und giftig ist. Die Gefäße werden neben einer Glaspetrischale mit 1 ml Dichlordimethylsilan in einen Exsikkator gelegt. Anschließend wird der Exsikkator solange evakuiert, bis das Dichlordimethylsilan seinen Siedepunkt erreicht hat. Wenn alles Dichlordimethylsilan verdampft ist, kann der Glashahn des Exsikkators geöffnet und die Gefäße entnommen werden. Nach dem Herausnehmen müssen die silanisierten Gefäße und der Exsikkator noch ca. einen Tag im Abzug gelagert werden, um überschüssiges Dichlordimethylsilan abdampfen zu lassen.

3.6.3.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Um verdünnte Proteinproben für weitere Analysen zu konzentrieren, wird die Fällung mit dem denaturierenden Agens Trichloressigsäure (TCA) eingesetzt. Die Fällung wird durch andere denaturierende Reagenzien wie Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid (GuaHCl) nicht gestört. Da GuaHCl die SDS-Gelelektrophorese stört, ist die TCA-Fällung von GuaHCl-haltigen Proben vor der Elektrophorese notwendig.

Zu einer Proteinlösung wird das gleiche Volumen eiskalte 10 % TCA pipettiert. Nach kurzem Mischen wird 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird 15 min zentrifugiert (16100 x g, 4 °C). Nachdem der Überstand mit einer Pipette abgezogen wurde, wird das Sediment zweimal mit eiskaltem 96 % Aceton gewaschen. Ist überschüssiges Aceton verdunstet, wird die Probe im gewünschten Puffer resuspendiert.

gesättigte TCA-Lösung		Volumen/Einwaage
Trichloressigsäure*	100 % (w/v)	500 g
H ₂ O		227 ml

* unter Rühren bei 60 °C lösen und abkühlen lassen

3.6.3.3 *Proteinfällung mit Methanol/Aceton*

Durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln wird die Dielektrizitätskonstante der Lösung erniedrigt, wodurch die Solvatationskraft der wässrigen Lösung für gelöste Proteine herabgesetzt wird. Dies begünstigt die Aggregation von Proteinen durch elektrostatische Wechselwirkungen. Die wässrige Proteinlösung wird mit 5 Volumen eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) gemischt und die Proteine über Nacht bei -80 °C gefällt. Der Niederschlag wird durch Zentrifugation (30 min, 16000 x g, 4 °C) sedimentiert. Nach Abnahme des Überstands wird das Proteinpräzipitat getrocknet und im gewünschten Puffer aufgenommen.

3.6.3.4 *Renaturierung durch Dialyse*

Die Darstellung löslicher und aktiver eukaryotischer Proteine durch Expression in Prokaryoten ist zum Teil schwierig. Die Überexpression führt oft zu unlöslichen Aggregaten fehlgefalteter Proteine, die zwar leicht isoliert werden können, deren Solubilisierung aber nur unter denaturierenden Bedingungen möglich ist. Um eine native Faltung zu erreichen, muss die Konzentration des denaturierenden Agens reduziert werden, ohne die gleichzeitige Aggregation durch Fehlfaltungen zu fördern. Neben der Renaturierung durch sprunghafte Verdünnung (Middelberg 2002) kann die Dialyse verwendet werden, wenn die Konzentration des Proteins für einen Verdünnungsschritt zu gering ist. Die Zusammensetzung des Dialysepuffers hängt dabei von der weiteren Anwendung und von den Eigenschaften des betreffenden Proteins ab.

Die Dialyseschläuche werden vor Gebrauch in 1 L ddH₂O mit 1 % Na₂CO₃ (w/v) und einer Spatelspitze Na₂EDTA gekocht. Sämtliche Luftblasen müssen entfernt werden. Anschließend werden die Schläuche noch dreimal mit ddH₂O aufgeköcht, bis der pH-Wert annähernd neutral ist. Nach dem Abkühlen werden die Dialyseschläuche autoklaviert oder in 0,01 % NaN₃ (w/v) bei 4 °C gelagert.

Für die Dialyse wird die proteinhaltige Probe in einem verschlossenen Dialyseschlauch bei 4 °C im 100-fachen Volumen Dialysepuffer mit 10 % Glycerin für mindestens 8 h gerührt. Das Glycerin verhindert dabei den Wassereinstrom in den Dialyseschlauch. Im nächsten Schritt wird Dialysepuffer mit 50 % Glycerin verwendet, um das Volumen der Probe zu

verringern. Alternativ kann auch Polyethylenglycol (PEG 8000; 5-10 % w/v) im Dialysepuffer verwendet werden.

3.6.3.5 Proteinreinigung durch Metallaffinitätschromatografie

Die Reinigung erfolgt nach Herstellervorschrift (The QIAexpressionist 08/2002, Qiagen). Die Kapazität der Ni^{2+} -NTA-Agarose beträgt in Abhängigkeit vom Protein 5-10 mg/ml. Bei niedriger Expressionsrate muss ein großes Volumen exprimierender Zellen in einem geringen Volumen Lysepuffer aufgenommen werden, um einen höheren Konzentrationsfaktor zu erreichen. Zunächst wird das nötige Kulturvolumen für die präparative Expression an Hand der Tabelle 3 des Handbuches bestimmt. Dieses hängt vom Expressionsgrad des Proteins ab, der über SDS-PAGE abgeschätzt wird.

Für die denaturierende Aufreinigung des Proteins (Protokoll 10) wird das Zellsediment (3.6.2) in Puffer A (ca. 5 ml/g Zellsediment) aufgenommen. Für die Lyse bieten sich 8 M Harnstoff oder 6 M GuaHCl an. Während Harnstoff die schonendere Variante bietet und die Proben direkt für SDS-PAGE verwendet werden können, ist GuaHCl bei der Lyse der Zellen viel effizienter, erhöht außerdem die Löslichkeit des Proteins und wird daher in dieser Arbeit verwendet. Ein Nachteil besteht darin, dass GuaHCl die SDS-Elektrophorese stört und z.B. durch TCA-Fällung (3.6.3.2) entfernt werden muss. Nachdem das Zellsediment in Lysepuffer resuspendiert wurde, kann es eingefroren gelagert werden. Zum Vervollständigen der Lyse wird die Probe ca. 30-60 min unter rotierender Bewegung aufgetaut und anschließend abzentrifugiert (30 min, 16000 x g). Da der Überstand mit dem überexprimierten Protein wegen der enthaltenen genomischen DNA eine hohe Viskosität hat, wird die Lösung mit Ultraschall behandelt (4 x 10 sec, bei 30 %, Bandelin Sonopuls, Sonotrode: UW2070), um die DNA zu scheren. Vom Überstand und dem Sediment werden 100 µl abgenommen und für die SDS-PAGE aufbewahrt.

1 ml Ni^{2+} -NTA-Agarose wird zweimal mit dem fünffachen Volumen Puffer A äquilibriert und 5 min bei 200 x g abzentrifugiert. Die Bindung des Proteins an die mit Ni^{2+} beladene Agarose geschieht durch Mischen des Lysats mit dem Säulenmaterial unter rotierenden Bewegungen bei 4 °C über Nacht. Die Effizienz der Bindung kann noch erhöht werden, indem ein silanisiertes Gefäß (3.6.3.1) verwendet wird, so dass kein Protein an die Wand des Gefäßes bindet. Die Suspension wird in eine Säule (econo column, BioRad; 1,5 cm Durchmesser) gegeben und mit je 10 Volumen Puffer B und C bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min gewaschen, bis eine OD_{280} von < 0,01 erreicht wird. Die Elution erfolgt mit 10 Volumen der Puffer D und E im kontinuierlichen Gradienten oder in Stufen. Die gesamte Reinigung umfasst einen Harnstoffgradienten (8-2 M; Puffer B, C, D) zur Renaturierung,

einen pH-Gradienten zum Ablösen unspezifischer Bindungen (pH 8-4,5; Puffer B, C, D, E) und einen ansteigenden Imidazol-Gradienten (30-250 mM; Puffer D, E) zur Elution der spezifisch gebundenen Proteine. Das Volumen der gesammelten Fraktionen beträgt 1 ml. Das Elutionsprofil wird durch SDS-Gelelektrophorese und Bestimmung der Proteinkonzentration analysiert.

Puffer A (Lysepuffer)	
GuaHCl	6 M
Tris-HCl	10 mM
NaH ₂ PO ₄	100 mM
Glycerin	5 % (v/v)
pH 8,0 mit NaOH	
Puffer C (Waschpuffer)	
Harnstoff	4 M
Tris-HCl	10 mM
NaH ₂ PO ₄	100 mM
Imidazol	bis 30 mM
TritonX-100	0,2 % (v/v)
NaCl	1 M
PMSF	0,1 mM
pH 6,3 mit HCl	
Puffer E (Elutionspuffer)	
Harnstoff	2 M
Tris-HCl	10 mM
NaH ₂ PO ₄	100 mM
Imidazol	250 mM
PMSF	0,1 mM
pH 4,5 mit HCl	

Puffer B (Waschpuffer)	
Harnstoff	8 M
Tris-HCl	10 mM
NaH ₂ PO ₄	100 mM
Imidazol	bis 30 mM
TritonX-100	0,1 % (v/v)
NaCl	500 mM
PMSF	0,1 mM
pH 8,0 mit NaOH	
Puffer D (Waschpuffer)	
Harnstoff	2 M
Tris-HCl	10 mM
NaH ₂ PO ₄	100 mM
Imidazol	bis 30 mM
TritonX-100	0,2 % (v/v)
NaCl	1 M
PMSF	0,1 mM
pH 5,9 mit HCl	

Unspezifische Proteinbindung kann durch Zusätze zum Puffer vermieden werden. Die Bedingungen müssen für jedes Protein neu bestimmt werden. Mit Glycerin (bis 30 %) oder TritonX-100 (bis 1 %) werden hydrophobe Wechselwirkungen, mit NaCl (bis 2 M) elektrostatische Wechselwirkungen und mit Imidazol (bis 30 mM) werden unspezifische Bindungen zu anderen histidinreichen Proteinen vermieden oder reduziert.

3.6.4 Abspaltung des N-terminalen His₆-Fusionspeptides

Zur Herstellung von Antikörpern gegen ein überexprimiertes und mit IMAC (immobilized metal affinity chromatography; 3.6.3.5) aufgereinigtes Protein muss die Affinitätsmarkierung (6 x His) entfernt werden. Dies ist vor allem wichtig, wenn das gewünschte Protein *in vivo* bzw. in einem Zelllysate vorkommt, in dem viele histidinreiche Proteine enthalten sind, um eine spezifische Detektion zu ermöglichen. Zur Abspaltung des hier verwendeten

Fusionspeptides wird Enterokinase (eine Endopeptidase aus Kälberdarm; E.C.3.4.21.9.) verwendet, die nach der Aminosäuresequenz (Asp)₄-Lys spezifisch spaltet. Der optimale pH-Bereich der Reaktion ist pH 7,0-8,0. Da Phosphat und NaCl das Enzym hemmen, werden diese Ionen durch Dialyse (3.6.3.4) entfernt. Vor der Abspaltung wird die Konzentration des Fusionsproteins auf 0,3-1 mg/ml eingestellt. Der pH sollte im Bereich pH 6,0-8,5 eingestellt werden. Zum Abspalten des Fusionspeptides werden 25 µg Fusionsprotein mit 1/20-1/200 der Menge Enterokinase inkubiert. Nach 1, 3, 6, 24 h wird ein Aliquot entnommen. Um eine unspezifische Spaltung durch Autolyse oder Proteasekontamination zu erkennen, ist eine Kontrollinkubation ohne Enterokinase notwendig. Anschließend werden die Spaltungsreaktionen, die Kontrollprobe und eine Probe ungespaltenes Fusionsprotein mit SDS-PAGE (3.7.1) analysiert.

3.7 Charakterisierung von Proteinen

3.7.1 Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Da Polyacrylamid-Gele aus toxischen Substanzen bestehen, werden sie immer unter dem Abzug gegossen und bis zur vollständigen Polymerisation gelagert. In dieser Arbeit wird die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) angewandt. Das Prinzip beruht auf der Verwendung zweier Gelsysteme, die sich durch Puffer (pH, Ionenart, Ionenstärke) und Gelkonzentration unterscheiden. Im engmaschigen Trenngel wandern die Proteine unterschiedlich schnell. Dieses wird mit einem großporigen Sammelgel überschichtet. Der Puffer im Sammelgel liegt um zwei pH-Einheiten unter dem des Trenngels. Das bewirkt einen Sammeleffekt, wodurch alle Proteine einer Spur in einer schmalen Bande konzentriert werden. Haben die Proteine das Trenngel erreicht, wird dieser Effekt aufgehoben und die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Der Vorteil der Disc-Elektrophorese liegt in schärferen Banden und einer höheren Auflösung der Bandenmuster.

Um Proteine entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, müssen diese vorher denaturiert werden, da sonst die eigene Konformation (Form und Größe) und Ladung die Mobilität im Gel beeinflussen. Hierfür eignet sich das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) besonders gut, da es Proteine in einem relativ konstanten Verhältnis (1,4 g SDS/1 g Protein) bindet. Dadurch erhalten die Proteine eine zu ihrer Länge proportionale negative Ladung und wandern zur Anode. Die resultierende Mobilität ist dem Logarithmus der Masse umgekehrt proportional. Über einen geeigneten Längenstandard kann das gesuchte Protein seinem Molekulargewicht zugeordnet werden.

Für die Durchführung der Elektrophorese müssen zuerst zwei Glasplatten mit Spülmittel, ddH₂O und Ethanol fettfrei gereinigt werden. Eine Platte wird an drei Seiten mit Silikonstreifen versehen, die zweite Platte darauf gelegt und beide Platten mit Klammern fixiert. Der Hohlraum wird mit Wasser gefüllt, um zu überprüfen, ob die Platten dicht sind. Zur Herstellung des Trenngels wird die entgaste Gellösung zwischen die Glasplatten bis ca. 2 cm unter den Rand gegossen. Anschließend wird das Gel mit ddH₂O überschichtet, um eine gleichmäßige Polymerisation der Oberfläche unter Luftabschluß zu garantieren. Nach erfolgter Polymerisation (~ 10-15 min) wird das Wasser entfernt, die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und der Taschenformer eingepasst. Nach beendeter Polymerisation muss der untere Silikonstreifen entfernt werden. Die seitlichen Streifen werden noch einmal an das Gel gedrückt, um entstandene Lücken zu schließen. Nach dem Einspannen der Glasplatten in die Elektrophoreseapparatur müssen die Luftblasen am unteren Rand beseitigt und die Taschen ausgespült werden, um letzte Polymerreste zu entfernen.

Die zu analysierenden Proben (Kultur wie in 3.6.1 beschrieben oder 1-10 µg Protein) werden mit 2 x SDS-Probenpuffer gemischt. Um die Proteine zu denaturieren, wird die Probe direkt vor dem Auftragen 5 min gekocht. Die Elektrophorese beginnt mit 75 bzw. 100 V (Gelmaße: 9 x 12 cm bzw. 16 x 14 cm) und wird nach Erreichen der Bromphenolblaufront im Trenngel auf 100 bzw. 160 V für ca. 4 h erhöht. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel mit Coomassie Brilliant Blau R 250 gefärbt (3.7.3.1) und unter Weißlicht fotografiert.

Trenngel (30 ml)		Volumen	
		12,5 %	15 %
AA:BisAA (40 %, 29:1)	12,5/15 % (w/v)	9,4 ml	11,25 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	375 mM	7,5 ml	7,5 ml
10 % SDS	0,1 % (w/v)	300 µl	300 µl
TEMED	0,1 % (v/v)	30 µl	30 µl
10 % APS	0,1 % (w/v)	300 µl	300 µl
ddH ₂ O		12,7 ml	10,9 ml

Sammelgel (10 ml)		Volumen
AA:BisAA (40 %, 29:1)	4 % (w/v)	1 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	125 mM	2,5 ml
10 % SDS	0,1 % (w/v)	100 µl
TEMED	0,1 % (v/v)	10 µl
10 % APS	0,1 % (w/v)	100 µl
ddH ₂ O		6,29 ml

SDS-Probenpuffer	2 x	5 x
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	100 mM	250 mM
10 % SDS	4 % (w/v)	20 %
Glycerin	17 % (v/v)	20 %
1M β -Mercaptoethanol	0,1 % (v/v)	0,1 %
1 % Bromphenolblau	0,1 % (w/v)	0,1 %

Harnstoff-Probenpuffer	2 x
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	100 mM
10 % SDS	4 % (w/v)
Harnstoff	3,6 M
Glycerin	17 % (v/v)
1M β -Mercaptoethanol	0,1 % (v/v)
1 % Bromphenolblau	0,1 % (w/v)

Elektrophorese-Puffer	
Tris	45 mM
Glycin	200 mM
10 % SDS	0,15 % (w/v)

3.7.2 Polyacrylamidelektrophorese unter nativen Bedingungen

Die Elektrophorese unter nativen Bedingungen trennt Proteine nicht nach ihrer Größe, sondern nach ihren charakteristischen Eigenschaften. Dabei spielen die Form, die Größe und der Ladungszustand des Proteins eine Rolle. Die Elektrophorese muss bei niedrigen Spannungen durchgeführt werden, um einem Erhitzen des Gels und der daraus resultierenden Denaturierung der Proteine vorzubeugen. Zusätzlich kann die Elektrophorese im Kühlraum bei 4 °C und wenn möglich mit einer kühlbaren Apparatur durchgeführt werden.

Natives PAA-Gel (40 ml)		Volumen
AA:BisAA (40 %, 29:1)	5,6 % (w/v)	5,6 ml
5 x TB oder 5 x TG	1 x	4 ml
TEMED	0,1 % (v/v)	0,04 ml
APS	0,1 % (w/v)	0,4 ml
H ₂ O		29,96 ml

Probenpuffer für native PAGE	
Glycerin	50 % (v/v)
Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
Xylencyanol FF	0,03 % (w/v)

5 x TB-Puffer, pH 8,3	
Tris-HCl	450 mM
Borsäure	450 mM

5 x TG-Puffer, pH 8,3	
Tris-HCl	125 mM
Glycin	1250 mM

Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 30 V so lange durchgeführt, bis die Proben ins Gel eingelaufen sind; die weitere Auftrennung erfolgt bei 300 V_{max} (Gelmaße: 20 x 20 x 0,1 cm, 3-4 h; 20 x 40 x 0,1 cm, über Nacht) und einer Gesamtleistung von 10 W_{max}.

3.7.3 Dokumentation von Proteingelen

3.7.3.1 Coomassie-Blau-Färbung

Die Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R 250 ist eine einfache und schnelle Methode zum Nachweis von Proteinen in Gelen. Die Nachweisgrenze liegt bei 100 ng. Der negativ geladene Farbstoff bindet unter sauren Bedingungen an Arginin im Protein.

Das Proteingel wird für 30 min in der Färbelösung geschüttelt. Zum Entfärben wird das Gel in die Entfärbelösung gegeben. Nach ca. 1 h sollte die Entfärbelösung gewechselt und über Nacht weiter entfärbt werden. Um eine bessere Entfärbung zu erreichen, kann zusätzlich ein Schwamm in die Lösung gelegt werden.

Coomassie-Färbelösung	
Coomassie Brilliant Blau R 250	0,2 %
Methanol	45 %
Essigsäure	10 %

Entfärbelösung	
Methanol	35 %
Essigsäure	7 %

3.7.3.2 Trocknen von Polyacrylamidgelen

Das Proteingel wird auf ein in Entfärber äquilibriertes Filterpapier entsprechender Größe gelegt und mit einer in ddH₂O gequollenen Zellophanfolie bedeckt. Der Stapel wird zwischen zwei dicken Filterpapieren und unter Vakuum je nach Dicke 15-60 min bei 60 °C getrocknet.

3.7.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Diese 1976 von M. M. Bradford veröffentlichte Färbemethode beruht auf der Bindung des sauren Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G 250. Im sauren Milieu verschiebt sich in Gegenwart von Proteinen das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 zu 595 nm. Grund dafür ist die Stabilisierung der unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung zwischen Protein und Farbstoff. Dabei bindet der Farbstoff unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten des Proteins. Die wichtigste Rolle spielen dabei Wechselwirkungen mit dem basischen, unter den Testbedingungen am terminalen Stickstoff protonierten Arginin. Weniger wichtig sind Wechselwirkungen mit

Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Daher ist die Lichtabsorption der Lösung bei 595 nm annähernd proportional zur Proteinkonzentration in Lösung.

Die Vorteile des Bradford-Nachweises zur Proteinkonzentrationsbestimmung liegen in seiner einfachen Durchführung und seiner Unempfindlichkeit gegenüber Reduktionsmitteln. Ein Nachteil besteht darin, dass gleiche Massen an verschiedenen Standardproteinen aufgrund unterschiedlicher Farbstoffbindung erhebliche Differenzen in ihren resultierenden Absorptionskoeffizienten verursachen können.

Bradford-Lösung:

100 mg Coomassie-Brillant-Blau G 250 werden in 50 ml 96 % EtOH gelöst. Die Lösung wird über mehrere Stunden gerührt und anschließend 100 ml 85 % H₃PO₄ und 850 ml ddH₂O zugegeben. Die Lösung wird zweimal durch drei Lagen Filterpapier filtriert und kann bei 4 °C im Dunkeln über mehrere Monate gelagert werden.

Durchführung:

10 µl Proteinlösung werden mit 0,25 ml Bradford-Lösung gemischt und nach fünf Minuten die Absorption bei 595 nm fotometrisch bestimmt. Als Referenz wird eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin (BSA) bekannter Konzentration (0-5 mg/ml) im gleichen Puffer erstellt. Da beide Spezies des Farbstoffes (protoniert, unprotoniert) interferieren, ist die Standardkurve nicht linear. Bei der Auswertung ist deshalb zu beachten, dass die Bradford-Methode nur im linearen Bereich der Eichkurve zuverlässige Werte liefert. Die zu messenden Proben sind entsprechend zu verdünnen.

3.7.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen durch UV-Messung

Christian und Warburg ermittelten eine allgemeine Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen bei einer Wellenlänge von 280 nm und 260 nm. Bei 280 nm absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, in geringerem Maß auch Phenylalanin. Da Proteinlösungen oft durch Nukleinsäuren verunreinigt sind, die bei 260 nm und bei 280 nm absorbieren, wird zur Konzentrationsbestimmung auch der Absorptionswert bei 260 nm verwendet. Die beiden Messwerte werden nach folgender empirisch ermittelter Formel zueinander in Beziehung gesetzt.

$$\text{Proteinkonzentration (in mg/ml)} = (1,55 - E_{280}) : (0,76 - E_{260})$$

Diese Methode orientiert sich maßgeblich an Tryptophan, welches den bei weitem größten molaren spektralen Absorptionskoeffizienten (ϵ) besitzt: Der molare Absorptionskoeffizient eines Proteins setzt sich additiv aus den einzelnen Beträgen der enthaltenen Aminosäuren zusammen und kann bei www.ebi.ac.uk/service/tmp/pepstats oder www.expasy.org ermittelt werden. Die Vorteile dieser Methode sind ihre schnelle und einfache Anwendbarkeit und ihre geringe Störanfälligkeit gegenüber der Absorption von Nichtproteinsubstanzen. Proteine, die mit TritonX-100 solubilisiert wurden, können aufgrund der hohen Eigenabsorption des Detergens bei 280 nm nicht bestimmt werden.

3.7.6 Untersuchung von Protein-RNA-Wechselwirkungen

Im Vergleich zu ungebundenen Nukleinsäuren verlangsamen an Proteine gebundene Nukleinsäuren ihre Beweglichkeit bei gelelektrophoretischer Auftrennung. Je größer das gebundene Protein ist, desto größer ist auch die Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit. Dieses Phänomen bildet die Grundlage für EMSA-Experimente (*electrophoretic mobility shift assay*), durch die vermutete Interaktionen von DNA bzw. RNA mit Proteinen nachgewiesen werden können. Da die hier verwendeten Proteine wegen ihres hohen isoelektrischen Punkts (pI) in dem gewählten Puffersystem in protonierter Form vorliegen, ist ihre elektrophoretische Mobilität zur Kathode gerichtet. Ein Einwandern in das Gel ist unter den gewählten Bedingungen nur möglich, wenn eine Bindung zur RNA vorliegt. Die Wechselwirkungen von RNase P/MRP RNA und -Proteinen bestehen vermutlich aus wenigen elektrostatischen Interaktionen, sowie hydrophoben Wechselwirkungen. Da sie sehr labil sind, müssen die optimalen Bedingungen bestimmt werden, unter denen der Komplex während der Elektrophorese stabil bleibt. Neben der Wahl des Elektrophorese- und Gelpuffers (Tris-Borat, Tris-Acetat, Tris-Glycin, Glycin-MES, Imidazol-MES u.a.) und Detergenzien bieten sich Salze an, die mit dem Komplex elektrostatische Wechselwirkungen ausbilden können und durch die Konkurrenz um Hydrathüllen die Bildung eines hydrophoben Milieus innerhalb des Komplexes fördern, in dem die Bindungspartner näher zusammen rücken. Dieser Effekt kann auch durch eine Änderung der Ionenstärke des Gel- und Laufpuffers (z.B. 0,25 x, 0,5 x, 1 x TB usw.) herbeigeführt werden.

Vor dem Bindungsversuch muss die RNase P/MRP RNA in eine native Struktur gefaltet werden. Dazu wird sie zuerst denaturiert, indem sie 5 min bei 65-75 °C inkubiert wird. Die Renaturierung, also die Ausbildung der natürlichen Struktur, ist ein komplizierter Prozess, dessen Charakteristik ausgetestet werden muss. Er wird beeinflusst von der Zusammensetzung des umgebenden Mediums und der Geschwindigkeit, mit der die Temperatur nach dem Denaturieren gesenkt wird.

Zum Bindespuffer wird zuerst die gefaltete RNA sowie unterschiedliche Mengen des Proteins (dialysiert gegen Puffer F-GP) gegeben. Die Zusammensetzung des Bindungspuffers ist entscheidend für den Erfolg der Komplexbildung. Um die Komplexe zu stabilisieren, wird Glycerin oder BSA zum Bindungsansatz gegeben. Auch die Zusammensetzung der Salze und deren Konzentrationen im Reaktionsansatz tragen zur Bindung bei. Zur Komplexbildung wird das Protein-RNA-Gemisch für 30 min bei RT (25 °C, 350 U/min, Eppendorf Thermomixer) inkubiert. Zur Stabilisierung schwacher Interaktionen kann das Gemisch mit UV-Licht (256 nm, 5 min, d = 3 cm) bestrahlt werden. Das führt zu inter- und intramolekularen Crosslinks zwischen Protein und RNA.

Zur Analyse werden die Ansätze mit EMSA-Probenpuffer versetzt, kurz gemixt (Vortexer Genie 2, 600 U/min) und auf nativen Polyacrylamidgelen (3.7.2) bzw. Agarosegelen (3.2.1) elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird anschließend getrocknet. Da in dieser Arbeit die RNAs für die EMSAs radioaktiv markiert wurden, erfolgt die Detektion der freien bzw. komplexierten RNA durch Exposition des getrockneten Gels auf einer Imaging Plate (Fuji) im Phosphorimager. Alle Bilder wurden mit der Software AlphaEaseFC von Biozym densitometrisch ausgewertet.

Bindungsansatz		10 x Bindungspuffer	
10 x Bindungspuffer	1,5 µl	Tris-HCl, pH 8	100 mM
Protein	0,01-5 pmol	NaCl	500 mM
RNA	0,01-5 pmol	MgCl ₂	50 mM
ddH ₂ O	ad 15 µl	TritonX-100	1 % (v/v)
		DTT	10 mM
		RNasin	8 U
Puffer F-GP			
Tris-HCl pH 7,6	20 mM		
MgCl ₂	5 mM		
Glycerin	20 % (v/v)		
PMSF	0,5 mM		

3.7.7 Western Blot

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen sind nur schlecht für weitere biochemische und immunologische Untersuchungen zugänglich. Durch die Übertragung von Proteinen auf eine Membran (Western Blot) wird ein immunologischer Nachweis möglich. Als Membranmaterial werden Nitrozellulose, Nylon, PVDF (Polyvinylidendifluorid, Teflon) oder auch diazotiertes Papier verwendet. Es gibt drei Möglichkeiten, Proteine auf solche Membranen zu übertragen, einmal durch Diffusion, durch vakuumunterstützten Flüssigkeitsstrom oder elektrophoretische Elution. Der Western Blot nach Towbin et al. (1979) ist eine Methode der Elektrophorese, die als Nassverfahren (Tank-Blot) oder als Halbtrockenverfahren (Semi-Dry-

Blot) durchgeführt werden kann. Der Vorteil des verwendeten Semi-Dry-Transfers ist ein schneller und kompletter Übertrag der Proteine auf die Blotfolie. Der Erfolg des Übertrags wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst: der Zusatz von Methanol in den Transferpuffer verbessert die Bindung an die Membran, macht Proteine unlöslich und verhindert ein Quellen des Gels. Im Gegensatz dazu verbessert SDS die Wanderungsfähigkeit der Proteine, vermindert aber gleichzeitig die Bindung an die Membran. Zwischen diesen beiden Komponenten muss ein optimales Maß gefunden werden. Für dicke Gele ($> 0,75$ mm) ist eine verlängerte Äquilibrierdauer für einen kompletten Übertrag notwendig, sie senkt die Gefahr der Erwärmung des Gels. Auch die Dauer des Transfers und die angelegte Stromstärke beeinflussen den Transfer entscheidend.

Der Blotaufbau erfolgt entsprechend Abb. 19. Das Proteingel mit 0,75 mm Dicke wird ca. 1 h in Kathodenpuffer mit 0,05 % SDS äquilibriert. Dieser enthält wie alle Puffer 20 % Methanol. Die PVDF-Membran wird kurz in Methanol benetzt und 15 min in Anodenpuffer 2 äquilibriert. Das Gel wird auf die PVDF-Membran gelegt und mit Filterpapieren abgedeckt. Die Filterpapiere dürfen nicht überhängen, da sonst ein Kurzschluss entsteht. Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten werden durch vorsichtiges Überrollen mit einem angefeuchteten Glasröhrchen entfernt. Das Blotsandwich wird zwischen zwei Elektroden aufgebaut, so dass senkrecht zum Gel ein elektrisches Feld erzeugt wird. Dadurch wandern die Proteine entlang eines elektrischen Feldes Richtung Anode zur Membran und werden durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Die Elektrophorese wird mit maximal 20 V und $1,25 \text{ mA/cm}^2$ in der Transblot Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) für eine Dauer von 1,5 h durchgeführt.

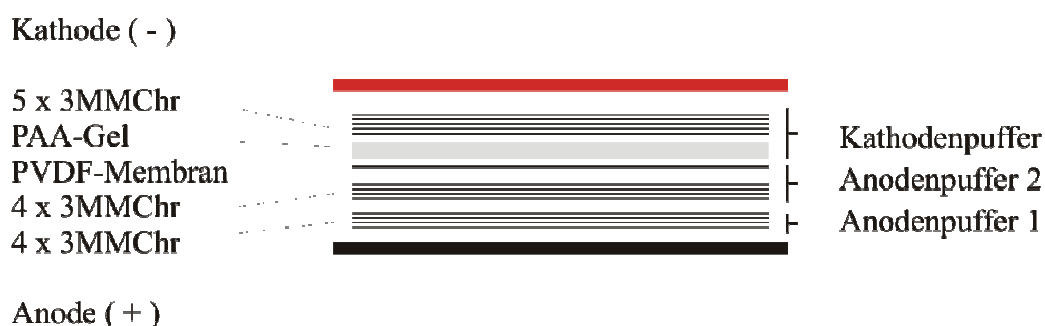


Abb. 19: Aufbau des Western Blot-Stapels

Nach beendetem Transfer wird die Oberseite der PVDF-Folie markiert und diese kurz in TBS bzw. PBS gespült, um noch anhaftende Salze zu entfernen. Die anschließende Lufttrocknung dient dazu, die Proteine besser an die Membran zu fixieren. Um die Membran wieder hydrophil zu machen, wird sie kurz mit Methanol benetzt, das die Bindung zusätzlich festigt,

und in TBS bzw. PBS gewaschen. Bis zur Weiterverwendung der Membran für Farbstoff- oder Immunfärbung kann die Membran in TBS bzw. PBS bei 4 °C gelagert werden.

Anodenpuffer 1	
Tris-HCl, pH 10,4	300 mM
Methanol	20 % (v/v)

Anodenpuffer 2	
Tris-HCl, pH 10,4	30 mM
Methanol	20 % (v/v)

Kathodenpuffer	
Tris-HCl, pH 9,4	25 mM
Methanol	20 % (v/v)
SDS	0,05 % (w/v)

10 x PBS-Puffer	
NaCl	1,37 M
KCl	26,8 mM
Na ₂ HPO ₄	100 mM
KH ₂ PO ₄	19,19 mM
10 x TBS-Puffer	
Tris-HCl, pH 7,6	400 mM
NaCl	2,75 mM

3.7.7.1 Übersichtsfärbung mit Ponceau S

Die Passivfärbung der Membran mit dem roten Azofarbstoff wird zur Kontrolle des Transfers und der Lokalisierung der Probenpositionen und Längenstandards durchgeführt. Sie hat den Vorteil, dass die Bindung des Farbstoffes an Proteine reversibel ist. Durch einfaches Auswaschen mit Wasser ist die Blotmembran für nachträgliche immunchemische Nachweistechiken zugänglich. Ein Nachteil besteht aber in der geringen Empfindlichkeit.

Direkt nach dem Proteintransfer auf die Membran wird diese dreimal je 5 min in ddH₂O gewaschen und anschließend 1 min in der Färbelösung geschwenkt. Zum Schluss wird die Membran mehrmals mit ddH₂O gewaschen, bis der Hintergrund entfärbt und die Proteinbanden deutlich zu erkennen sind. Mit einem wasserfesten Stift werden die Banden des Längenstandards markiert und die Membran fotografiert.

Ponceau S-Färbelösung	
Ponceau S	0,2 % (w/v)
Trichloressigsäure	3 % (w/v)

3.7.7.2 Immunologischer Nachweis durch Antikörper- gekoppelte Enzyme

Der Proteinnachweis mit Antikörpern wird auf Western Membranen durchgeführt. In Abhängigkeit vom Sekundärantikörper und dem gekoppelten Enzym wird TBS bzw. PBS als Puffersystem für die Wasch- und Blockierlösungen verwendet. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern, wird diese 1h bis über Nacht in Blockierlösung geschwenkt. Für die Bindung der Antikörper an das Protein wird die

Membran über Nacht mit dem Primärantikörper (in Blockierlösung, 0,1-0,2 ml/cm²) bei 4 °C geschüttelt und anschließend dreimal je 5 min mit Waschlösung gewaschen. Danach wird die Membran 1 h mit dem Sekundärantikörper (α -*rabbit* IgG-AP-Konjugat, Sigma, 1:10000 in TBS-Blockierlösung bzw. α -*rabbit* IgG-HRP-Konjugat, Sigma, 1:5000 in PBS-Blockierlösung) bei 4 °C geschüttelt. Ungebundene Antikörper werden mit Waschpuffer (3 x 5 min) entfernt. Restliches Tween 20 wird durch zweimaliges Spülen in TBS/ PBS entfernt. Für den Farbnachweis wird die Membran 1-15 min mit Substratlösung (0,1-0,2 ml/cm²; NBT/BCIP für alkalische Phosphatase bzw. Luminol für Peroxidase) im Dunkeln inkubiert. Die Farbentwicklung des NBT/BCIP wird durch zweimaliges Waschen für 5 min in ddH₂O gestoppt. Der gefärbte Blot wird unter Weißlicht (NBT/BCIP) bzw. im Dunkeln mittels einer Chemilumineszenzkamera (Luminol) fotografiert und kann bei 4 °C gelagert werden.

Waschpuffer	
10 x TBS/PBS	1 x
Tween 20	0,3 % (v/v)

Blockierlösung	
10 x TBS/PBS	1 x
Tween 20	0,1-0,2 % (v/v)
Magermilchpulver	3 % (w/v)

Substratlösung	Volumen
Phosphatasepuffer	5 ml
NBT (25 mg/ml)	33 µl
BCIP (50mg/ml)	16,5 µl

Phosphatasepuffer	
Tris-HCl, pH 9	100 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	50 mM

Luminollösung	Volumen
Luminol	50 µl
Enhancerlösung	2 ml

3.7.8 Präparation prozessierungsaktiver Extrakte aus Pflanzen

3.7.8.1 Präparation eines S23-Proteinextraktes aus Weizenkeimen

Unbehandelte Weizenkeime (SynPharma, Augsburg) werden mit Aceton entfettet (Arends und Schön 1997). 2 g der so behandelten Weizenembryonen werden mit 8 ml Extraktionspuffer in einem 50 ml Falconröhrchen gemischt und mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Dispergierwerkzeug S25N 18G) bei 13500 U/min zerkleinert, bis eine homogene Masse entsteht. Das Homogenat wird in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 23000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird nochmals zentrifugiert und anschließend zweimal gegen 100 Volumen Extraktionspuffer dialysiert (MWCO 7 kDa). Der dialysierte Proteinextrakt wird zentrifugiert (10 min, 23000 x g, 4 °C), aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgt nach Bradford (3.7.4).

Extraktions-/Dialysepuffer	
Tris-Acetat, pH 7,6	10 mM
Mg(OAc) ₂	3 mM
KOAc	50 mM
DTT	1 mM
PMSF	0,1 mM

3.7.8.2 Präparation eines S23-Proteinextraktes aus Blumenkohl

Für die Extraktion von Proteinen wird frischer nicht chemisch behandelter Blumenkohl verwendet. Für die Präparation werden nur die Röschen (Blütenstände) verwendet, da nur sie einen aktiven Stoffwechsel und hohen Proteingehalt besitzen.

30 g Blumenkohlröschen werden in einem vorgekühlten Mixer mit 100 ml Extraktionspuffer (3.7.8.1) grob zerkleinert. Die Homogenisierung erfolgt mit einem Ultra-Turrax (Dispergierwerkzeug S25N 25G) bei 21500 U/min. Das Homogenat wird zweimal 30 min bei 23000 x g zentrifugiert und anschließend einmal gegen das 10-fache Volumen Extraktionspuffer dialysiert (MWCO 7 kDa). Da der Proteinanteil im Blumenkohlextrakt sehr niedrig ist, wird dem Dialysepuffer 10 % PEG 8000 zugegeben, um das Volumen des Extraktes zu verringern. Darauf folgt eine weitere Dialyse gegen das 100-fache Volumen Extraktionspuffer mit 10 % Glycerin. Bis zur weiteren Verwendung wird der S23-Extrakt bei -20 °C gelagert.

3.7.9 Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität aus Weizenkeimextrakt

Immunopräzipitationen dienen der spezifischen, selektiven Isolierung eines Antigens und seiner Komplexpartner aus Zellextrakten. Dabei ist die Präzipitation durch Kopplung der Antikörper an Protein A-Sepharose eine bevorzugte Methode. Protein A ist ein Zellwandprotein aus *Staphylococcus aureus* mit einer spezifischen Affinität zur F_c-Region von γ -Immunglobulinen. Es weist eine hohe pH-Stabilität von 2-10 auf, wobei die Bindungsaffinität zur Fc-Domäne pH-abhängig ist. Die Bindungsaffinität von Protein A kann abhängig von der Herkunft (Spezies) und Subklasse der Antikörper erheblich variieren.

3.7.9.1 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose

Die kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose erfolgt mit Abwandlungen nach Simanis und Lane (1985). Im ersten Schritt binden die Antikörper nichtkovalent an Protein A-Sepharose. Durch die Zugabe von Dimethylpimelimidat (DMP), einem Diimidsäuredimethylester, erfolgt die kovalente Kopplung. Sowohl primäre Amine (Lysin, N-Terminus der Peptid-Ketten) der Protein A-Sepharose als auch des Antikörpers reagieren

nukleophil mit dem Doppelerster; es kommt zur Verknüpfung. Durch reduktive Desaminierung werden stabile sekundäre Amine ausgebildet.

Alle Arbeiten werden bei 4 °C durchgeführt. Pro Präzipitationsansatz werden 100 µl Protein A-Sepharose-Suspension (50 %, w/v) zweimal in 500 µl PBS gewaschen und einmal in 500 µl PBS unter Schütteln 30 min vorgequollen. Nach Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge, 8000 U/min, 2 min) wird der Überstand abgenommen und die Sepharose kann für die Antikörperbindung verwendet werden.

Hierzu werden 200 µl Rohserum bzw. 0,2-1 mg gereinigte Antikörper (3.7.10), 100 µl Protein A-Sepharose (50 % Suspension in PBS vorbehandelt) und 500 µl PBS (pH 7,4) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dabei werden die Ansätze über Kopf rotiert, um ein Absetzen der Protein A-Sepharose am Reaktionsgefäßboden zu verhindern. Die Sepharose wird durch kurzes Zentrifugieren (Eppendorf Tischzentrifuge, 8000 U/min, 2 min) gesammelt und zweimal mit je 1 ml Boraxlösung gewaschen. Das Sediment wird in 500 µl Boraxlösung resuspendiert und DMP bis zu einer Endkonzentration von 40 mM zugegeben. Der Ansatz wird für 30 min unter Rotieren bei RT inkubiert, abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 8000 U/min, 2 min) und das Pellet zweimal mit je 1 ml 200 mM Ethanolamin (pH 8) gewaschen. Die Kopplungsreaktion wird in 1 ml 200 mM Ethanolamin (pH 8) durch Inkubation für 90 min unter ständiger Durchmischung (RT) gestoppt. Abschließend wird die Sepharose dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen, um nicht gekoppelte Antikörper abzutrennen. Die Effizienz der Kopplung kann durch Entnahme eines Aliquots vor und nach der Kopplung durch SDS-PAGE (3.7.1) überprüft werden.

Boraxlösung	
H ₃ BO ₃ (1 M, pH 9 mit NaOH)	100 mM
10 x PBS	1 x

3.7.9.2 Immunopräzipitation aus Weizenkeimextrakt

Vor der Immunopräzipitation werden unspezifisch an Protein A-Sepharose bindende Proteine abgetrennt. Hierzu wird S23-Proteinextrakt, der 0,1 mg Protein entspricht, mit Puffer F2 auf ein Volumen von 0,25 ml aufgefüllt und zu 100 µl vorbehandelter Protein A-Sepharose (in Puffer F2) gegeben. Der Ansatz wird über Nacht bei 4 °C über Kopf rotiert. Die Sepharose wird dann durch Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge, 8000 U/min, 2 min) abgetrennt und verworfen. Von dem so behandelten S23-Extrakt wird ein Aliquot zu 100 µl Antikörpergekoppelter Protein A-Sepharose gegeben, wiederum über Nacht bei 4 °C rotiert und zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 8000 U/min, 2 min). Der Überstand wird

abgenommen und das Pellet je viermal mit Puffer F1 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift und anschließender Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Sediment mit 50 µl Puffer F1 zu einer 50 % Suspension aufgefüllt. Die Suspension wird direkt in RNase P Prozessierungstests (3.8.2) eingesetzt. Neben verschiedenen Protease-Inhibitoren wird den hier verwendeten Puffern auch RNasin zugesetzt. RNasin ist ein Protein aus humaner Plazenta und bildet nichtkovalente äquimolare Komplexe mit RNasen. Es ist nur unter nicht-denaturierenden Bedingungen einsetzbar und benötigt für seine Aktivität reduzierende Pufferbedingungen. Alle verwendeten Puffer werden mit DEPC-H₂O angesetzt (3.4.1).

Puffer F1		Puffer F2	
Tris, pH 8	20 mM	Tris, pH 8	20 mM
MgCl ₂	5 mM	MgCl ₂	10 mM
		DTT	20 mM
		Glycerin	20 % (v/v)
		PMSF	1 mM
		Pepstatin	1 µM
		Leupeptin	2 µM
		RNasin	1 U/ml

3.7.9.3 Elution der immunopräzipitierten Proteine

Immunopräzipitierte Proteine können von den kovalent an Protein A-Sepharose gekoppelten Antikörpern eluiert werden. Hierzu wird die Suspension (100 µl) mit 500 µl IP-Elutionspuffer 5 min bei RT unter schütteln inkubiert, kurz abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 8000 U/min, 2 min) und der Überstand abgenommen. Der Vorgang wird dreimal wiederholt und die Proteinkonzentrationen spektralfotometrisch bestimmt (3.7.5). Die Konzentrierung der eluierten Proteine erfolgt durch Methanol-Aceton-Fällung (3.6.3.3). Die Protein A-Sepharose mit den gekoppelten Antikörpern kann danach wieder verwendet werden.

IP-Elutionspuffer	
Glycin	100 mM
pH 2,5-3 mit HCl	

3.7.10 Präparation von IgG aus Kaninchenserum durch Ammoniumsulfatfällung

Um die Spezifität eines Serums zu erhöhen, werden die Antikörper durch Ammoniumsulfatfällung fraktioniert. Durch die Zugabe von (NH₄)₂SO₄ bis zu 40 % Sättigung können γ-Immunglobuline aus dem Serum ausgefällt werden. Das Serum (0,5 ml) wird mit

dem gleichen Volumen eiskalten PBS (0,5 ml) versetzt. Zu dieser Lösung wird langsam die gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (1 ml) bei 4 °C unter leichtem Rühren zugegeben. Das Gemisch wird anschließend 1 h bei 4 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Das gefällte IgG wird abzentrifugiert (15 min, 5000 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Sediment wird in 0,8 ml ddH₂O resuspendiert und mit der Hälfte des gemessenen Probenvolumens an gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gemischt (Sättigung 33 %), 1/2 h auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert und zentrifugiert. Das Präzipitat wird zweimal mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (Sättigung 50 %) gewaschen und anschließend in 0,5 ml PBS gelöst und unter fünfmaligem Pufferwechsel gegen 100 ml PBS dialysiert (MWCO 30 kDa). Zur Klärung wird die Probe 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. Abschließend wird die IgG-Konzentration mittels Bradford-Assay (3.7.4) oder spektralfotometrisch (ϵ_{280} (10 %) = 1,4 cm²/mg) bestimmt.

Gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	754 g/L
(bei 60 °C lösen, abkühlen lassen)	
pH 7-8 mit NH_4 -Lösung	

3.7.10.1 Entfernung von *E. coli*-spezifischen Antikörpern aus einer IgG-Präparation

Antiseren immunisierter Tiere enthalten oft einen relativ hohen Anteil an Antikörpern, die bakterielle Antigene erkennen und deshalb bei der Analyse von Expressions-Bibliotheken in *E. coli*-Zellen zu hohen Hintergrundsignalen führen. Die in dieser Arbeit verwendete Methode von Gruber und Zingales (1995), abgewandelt nach Naß (1997), beruht auf der Inkubation der Antikörper-Lösung mit abgetöteten, unlöslichen *E. coli*-Zellen. *E. coli*-spezifische Immunglobuline lassen sich danach durch Zentrifugation (30 min, 5000 x g) leicht abtrennen.

Gewinnung des *E. coli*-Zellmaterials:

Es werden insgesamt 1 L (zweimal 500 ml in 2 L-Kolben) LB-Medium mit demjenigen *E. coli*-Stamm angeimpft, der für die Expression verwendet wird, und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (220 U/min). Eine Hälfte der Bakteriensuspension wird für 1 h bei 120 °C autoklaviert; die andere Hälfte wird mit 6,8 ml 37 % (w/v) Formaldehyd-Lösung (Endkonzentration 0,5 %) versetzt und für weitere 2 h bei 37 °C geschüttelt. Nach Abkühlen der autoklavierten Lösung werden beide Suspensionen vereinigt und anschließend zentrifugiert (10 min, 10000 x g, 4 °C). Das Sediment wird zweimal mit 250 ml 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Zellmaterial wird aliquotiert (je 0,2 g) und kann bei –20 °C gelagert werden.

Bindung und Abtrennung von *E. coli*-spezifischen Immunglobulinen:

Zu 10 ml einer 1x PBS-Lösung (mit 10 µg/ml BSA), die den aufzureinigenden Antikörper in einer 1:100 Verdünnung (v/v) enthält, werden 0,2 g der *E. coli*-Zelltrümmer gegeben. Diese Suspension wird 2 h bei 4 °C sanft geschüttelt und anschließend zentrifugiert (30 min, 5000 g, 4 °C). Der Überstand wird abgenommen und dieser Zyklus damit zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wird die Antikörperlösung durch eine 0,22 µm-Membran steril filtriert und mit PMSF (1 mM), Leupeptin (1 µM), Pepstatin A (2 µM), Glycerin (10 %), und NaN₃ (0,01 %) supplementiert. Die Lösung ist so über mehrere Wochen bei 4 °C haltbar und kann eingefroren gelagert werden.

3.7.10.2 Handhabung von Antikörpern

Antikörper sind als Antiserum am stabilsten und können so bei –20 °C über mehrere Jahre gelagert werden. Bei falscher Handhabung und Lagerung von Antikörperpräparationen kann es zu einem merklichen Verlust der Bindungsaktivität kommen. Dabei werden vor allem isolierte, reine Antikörper leicht durch bakterielles Wachstum oder durch Aggregieren, besonders aber durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren, geschädigt. Isolierte Antikörper können durch den Zusatz von 1 % BSA (w/v) vor Aggregation geschützt werden. Durch die Addition von 0,01 % NaN₃ (w/v) wird bakterielles Wachstum weitgehend gehemmt. Frische Antikörper-Präparationen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –20 °C bzw. einfrieruntaugliche Antikörper-Präparationen bei 4 °C gelagert. Um ein Austrocknen von eingefrorenen Antikörperproben und einen damit verbundenen Aktivitätsverlust bei längerer Lagerung zu verhindern, sollten die eingelagerten Proben mindestens die Hälfte des Röhrchenvolumens einnehmen. Zusätzlich wird der Druckverschluss mit Parafilm überzogen.

3.8 Prozessierung von Vorläufer-tRNA

3.8.1 *In vitro* Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P RNA

Die Ribozymreaktionen werden wie in Kikovska et al., 2007 bzw. Li et al., 2007 beschrieben durchgeführt. Um eine geeignete Faltung der RNA zu gewährleisten wird die Ribozym-RNA in Reaktionspuffer für 20 min bei 37 °C (Kikovska et al., 2007) bzw. 5 min bei 55°C und 35 min bei 37°C (Li et al., 2007) inkubiert. Das ³²P-markierte Substrat pre-tRNA^{Tyr} (5000 cpm) wird separat in Reaktionspuffer für 5 min bei 55°C und 20 min bei 37°C (Li et al., 2007) inkubiert. Der Reaktionsansatz wird für 2-24 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen dienen folgende Ansätze: Substrat in Reaktionspuffer ("Pufferkontrolle"); Substrat mit M1 RNase P

RNA in Hochsalzpuffer ("Prozessierungskontrolle"). Nach beendeter Reaktion wird das vierfache Volumen Stopplösung zugegeben und die RNAs mit Ethanol präzipitiert (3.1.1.1). Das Sediment wird in 10 µl Harnstoffpuffer aufgenommen und nach Hitzedenaturierung (94 °C, 2 min) zur Analyse auf ein 8 % PAA-Gel (Gelmaße: 20 x 20 x 0,04 cm) aufgetragen (3.2.3). Die Reaktionsprodukte werden im PhosphoImager sichtbar gemacht und quantifiziert.

2x Hochsalzpuffer		4x Li Puffer		4x Kikovska Puffer	
Tris, pH 8	50 mM	MES, pH 6	200 mM	MES, pH 6	200 mM
MgCl ₂	250 mM	Mg(OAc) ₂	680 mM	Mg(OAc) ₂	400 mM
NH ₄ Cl	2M	NH ₄ Cl	3,2 M	NH ₄ OAc	400 mM
				Na ₂ EDTA	8 mM
4x Stopplösung					
Na ₂ EDTA		25 mM			
Yeast carrier tRNA		10 µg/ml			

3.8.2 *In vitro* Prozessierung von pre-tRNA mit immunopräzipitierten Enzympräparaten

Das radioaktiv markierte Substrat pre-tRNA^{Tyr} (5000 cpm) wird direkt zum Immunopräzipitat gegeben, das zuvor in Puffer F1 (3.7.9.2) resuspendiert wurde. Die Reaktion wird, abhängig vom eingesetzten Enzym, bei 28-37 °C inkubiert. Die Reaktionszeit ist von Holoenzym und Zweck der Prozessierungsreaktion abhängig und kann bis zu 24 h dauern, um das Substrat vollständig zu spalten. Zur Kontrolle werden die unter (3.8.1) beschriebenen Reaktionen durchgeführt. Zusätzlich wird je ein Ansatz mit IgG-Protein-A-Sepharose ("IgG-Kontrolle") und mit S23 Weizenkeimextrakt ("Extraktkontrolle") inkubiert.

Prozessierungsreaktion mit Immunopräzipitat	
Immunopräzipitat	20 µl
pre-tRNA ^{Tyr}	5000 cpm

Die Probe wird nach der Reaktion phenolisiert und mit EtOH gefällt. Das Sediment wird in 10 µl Harnstoffpuffer aufgenommen und wie in (3.2.3) beschrieben analysiert.

4. Ergebnisse

4.1 Konstruktion von Transkriptionsklonen zur Präparation von RNase MRP RNAs aus *A. thaliana*

Für Struktur- und Funktionsuntersuchungen wurden die beiden identifizierten RNase MRP RNA-Strukturgene aus *A. thaliana* in einen T7-Transkriptionsvektor kloniert. Um die Funktion einiger Strukturelemente im Detail untersuchen zu können, wurden darüber hinaus verschiedene Varianten kloniert und transkribiert. Im Folgenden werden die RNase MRP RNAs und ihre Varianten aus *A. thaliana* mit MRPR bzw. im Fall von DNA als MRP abgekürzt.

MRP1 wurde mit den Primern 5'MRP2 + 3'MRP anti2 aus genomischer DNA amplifiziert und direkt in einen SmaI-geschnittenen pUC19 ligiert (pATMRP1). Um die T7-Transkription zu ermöglichen, wurde dieser Vektor als Matrize für eine PCR mit den Primern 5'MRPEcoT7 und 3'MRPFokHind verwendet. Das PCR-Produkt wurde mit EcoRI/HindIII geschnitten und in ebenso modifiziertes pUC19 ligiert (pT7ATMRP1). Für die T7-Transkription erfolgte die Linearisierung aller MRP-Konstrukte mit FokI, wenn nicht anders angegeben. MRP2 wurde mit den Primern 5'ATMRP2_fw und 3'MRP2_anti aus genomischer DNA amplifiziert und in SmaI-geschnittenes pUC19 ligiert (pATMRP2). Aus diesem Vektor erfolgte die Amplifikation mit den Primern 5'MRP2EcoT7 und 3'MRP2FokHind. Nach EcoRI/HindIII-Hydrolyse erfolgte die Ligation mit analog geschnittenem pUC19 (pT7ATMRP2). Um die isolierte P3 zu erhalten, wurden die Oligonukleotide ATMRP P3-top und ATMRP P3-bot mit pCR-XL-TOPO ligiert (je 2 µl der 10 µM-Primerlösungen für einen Ligationsansatz nach Herstellerangaben; pT7ATMRP-P3). Die S-Domäne wurde aus pATMRP1 mit den Primern 5'MRPSdomainEcoT7 und 3'MRPSdomainFokHind amplifiziert und nach EcoRI/HindIII-Hydrolyse in ebenso modifiziertes pUC19 ligiert (pT7ATMRP1-Sdom). Ein Transkriptionsvektor für die C-Domäne der MRP1 wurde durch Hydrolyse des Plasmides pT7ATMRP1 mit EcoRV und SmaI und anschließender Religation hergestellt (pT7ATMRP1-Cdom). Um MRP-Varianten ohne P3 zu erhalten, wurden PCR-Reaktionen analog der *QuikChange*-Mutagenese (3.3.3) mit den Primern 5'MRPΔP3 und 3'MRPΔP3 und den Plasmiden pT7ATMRP1 bzw. pT7ATMRP2 als Matrize durchgeführt. Die Merkmale dieser RNAs sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Zusammenfassung der hergestellten *A. thaliana* RNase MRP RNA-Transkripte

Name	Deletionen	Länge (Nt)	enthaltene Strukturbestandteile
MRPR1	-	264	P1, P2, P3, P4, P5/7, P8, P9, P10, P11, P12, P19 (vollständige RNA)
MRPR1-1 (MRPR1/C-Domäne)	S-Domäne	153	P1, P2, P3, P4, P19
MRPR1-2 (MRPR1 Δ P3)	Stamm der P3	245	P1, P2, P3 $_{\Delta 19}$, P4, P5/7, P8, P9, P10, P11, P12, P19
MRPR1-3 (MRPR1/S-Domäne)	C-Domäne	125	P5/7, P8, P9, P10, P11, P12
MRPR1-4 (MRPR1/P3)	P1, P2, P4, P5/7, P8, P9, P10, P11, P12, P19	31	P3
MRPR2	-	268	P1, P2, P3, P4, P5/7, P8, P9, P10, P11, P12, P15, P19 (vollständige RNA)
MRPR2-2 (MRPR2 Δ P3)	Stamm der P3	249	P1, P2, P3 $_{\Delta 19}$, P4, P5/7, P8, P9, P10, P11, P12, P15, P19

Die hier genannten Transkripte enthalten am 5'-Ende drei konsekutive Guanine und alle außer MRPR1-4 am 3'-Ende vier Uracile. Die Strukturen von MRP1, MRP1-1, MRP1-2, MRP1-3 und MRP2, MRP2-2 mit den benannten Strukturelementen befinden sich im Anhang (**Abb. 85**).

4.2 Analyse der RNase MRP RNA-Expression in *A. thaliana*

Untersuchungen von Kiss et al. (1992) zeigten, dass in *A. thaliana* eine, in Tabak zwei RNAs im Northern Blot mit der gleichen Sonde detektiert werden. Durch *in silico*-Analysen wurde in *A. thaliana* eine zweite RNA als MRPR2 annotiert (Piccinelli et al., 2005). Um die Expression beider MRPR-Varianten in *A. thaliana* zu überprüfen, wurde eine semiquantitative Analyse durch RT-PCR und Northern Blot durchgeführt. Die Sequenzen der beiden MRPRs sind in Abb. 20 dargestellt.

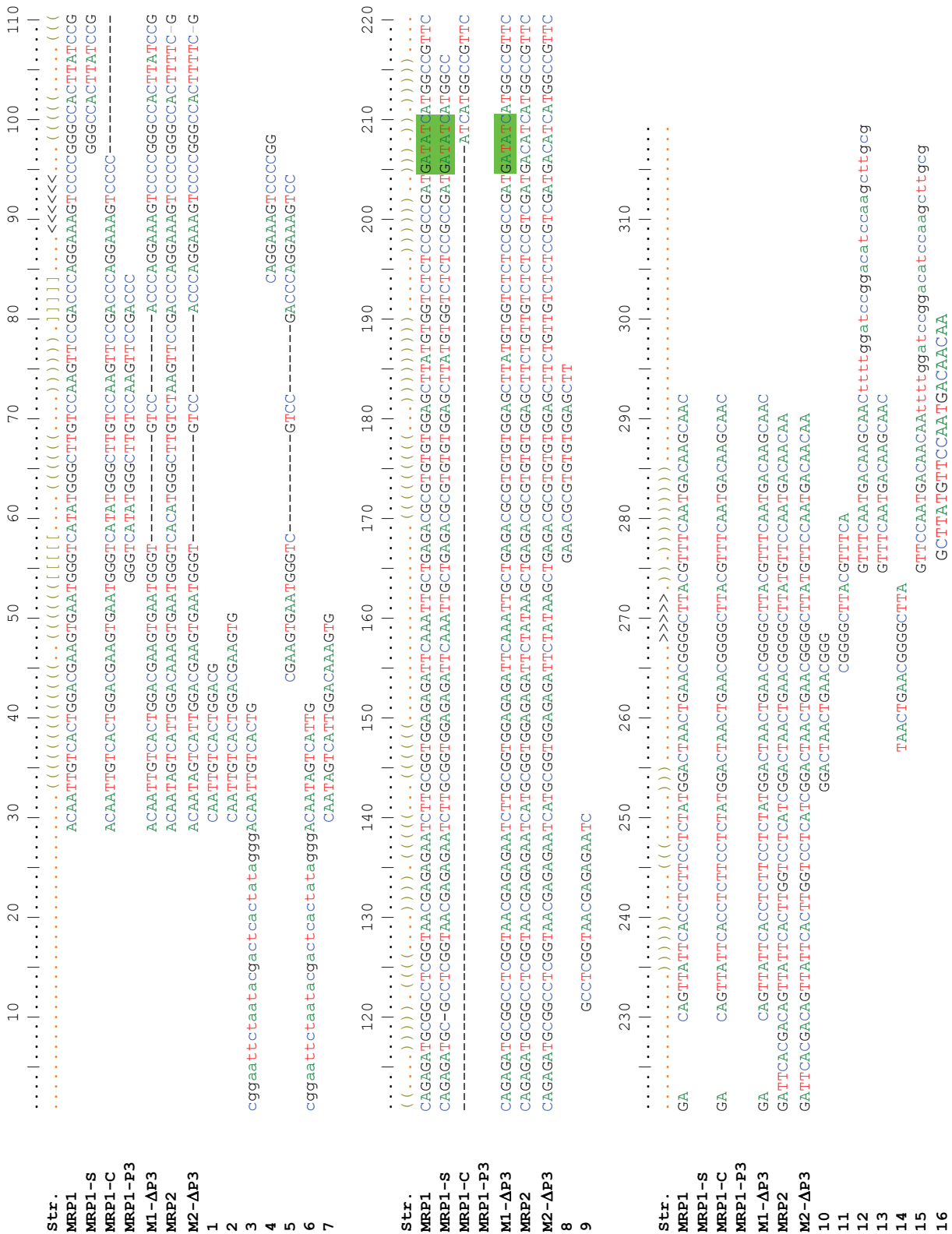


Abb. 20: Sequenzalignment der MRP-Varianten und der zur Analyse verwendeten Primer

Str: Die angegebene Struktur entspricht der MRPR1-Sekundärstruktur; helikale Strukturelemente: \circ , \diamond , ungepaarte Nukleotide: \cdot , grüne Schattierung: EcoRV-Palindrom, Primerbezeichnungen: 1: 5'MRP2, 2: 5'MRP2_1, 3: 5'MRP-EcoT7, 4: 5'MRP, 5: 5'MRP1deltaP3, 6: 5'ATMRP2-EcoT7, 7: 5'ATMRP2_fw, 8: 3'MRP-1u2-anti4, 9: 3'MRP-1u2-anti5, 10: 3'MRP-anti3, 11: 3'MRP-anti, 12: 3'MRP-FokHind, 13: 3'MRP-anti2, 14: 3'PlantMRP-CRV-antiA, 15: 3'ATMRP2-FokHind, 16: 3'ATMRP2-anti.

4.2.1 Nachweis der RNase MRP RNAs durch RT-PCR

In Vorversuchen wurde die optimale Temperatur des Primerpaares (5'MRP, 3'MRP-anti3) für die Amplifizierung beider MRP-Varianten ermittelt. Dazu wurde die PCR mit einem Temperaturgradienten während des Annealings durchgeführt. Als Matrize diente genomische DNA aus *A. thaliana*, die je eine Kopie beider Gene enthält. Bei $T_a = 54^\circ\text{C}$ werden beide MRP-Varianten gleich gut amplifiziert (Abb. 21, Probe K1). Aus zwei verschiedenen Gesamt-RNA-Extraktionen (3.1.7) wurden cDNAs mit einem Primer für beide MRPs (Primer: 3'MRP-anti3) hergestellt, die das Mengenverhältnis beider MRP RNAs zueinander widerspiegelt. Nach Reinigung dieser cDNAs (PCR Purification Kit, Roche) erfolgte die semiquantitative Bestimmung durch PCR mit den getesteten Primern 5'MRP und 3'MRP-anti3. Die PCR-Produkte der beiden MRP-cDNAs können durch Restriktionsanalyse mit EcoRV (siehe Abb. 20) unterschieden werden.

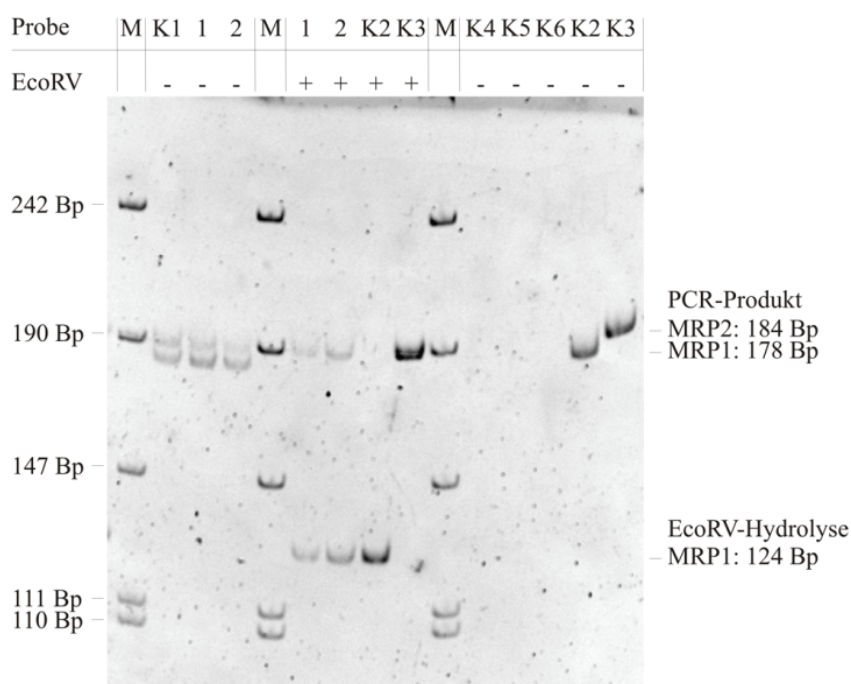


Abb. 21: Nachweis von MRP RNAs durch RT-PCR und Identitätskontrolle durch Restriktionshydrolyse mit EcoRV

Die Amplifikation (35 Zyklen) wurde mit den Primern 5'MRP und 3'MRP-anti3 durchgeführt. Folgende Templates wurden für die PCR eingesetzt: 1, 2: MRP-cDNA aus Gesamt-RNA 1 (250 ng) bzw. 2 (355 ng) aus *A. thaliana*; K1: genomische DNA aus *A. thaliana* (1 ng); K2: pATMRP1 (178 Bp; 0,02 ng); K3: pATMRP2 (184 Bp; 0,02 ng); K4: kein Templat; K5, K6: DNase I-behandelte Gesamt-RNA 1 (250 ng) bzw. 2 (355 ng) aus *A. thaliana*; M: pUCMix8-Marker; Längen der PCR- bzw. EcoRV-Hydrolyse-Produkte: MRP1 178 Bp bzw. 124 Bp + 54 Bp; MRP2 je 184 Bp (keine Hydrolyse durch EcoRV möglich).

Beide Sequenzen werden gleich effizient amplifiziert, wie in der PCR-Kontrolle mit genomischer DNA (K1) erkennbar ist. (Abb. 21). In zwei unabhängigen Gesamt-RNA Proben

aus *A. thaliana* konnte ein Überschuss der MRPR1 gegenüber der MRPR2 nachgewiesen werden. Um das Verhältnis beider RNAs genauer zu bestimmen, wurden PCRs mit unterschiedlicher Zyklenzahl durchgeführt. Das Amplifikationsprodukt der MRP1 ist dabei mindestens zwei Zyklen früher deutlich sichtbar als das MRP2-Produkt (Abb. 22; A: Spuren 7/8, B: Spuren 14/15 etc.). Dies entspricht etwa einem vierfachen Überschuss von MRPR1 gegenüber MRPR2 in *A. thaliana*-RNA.

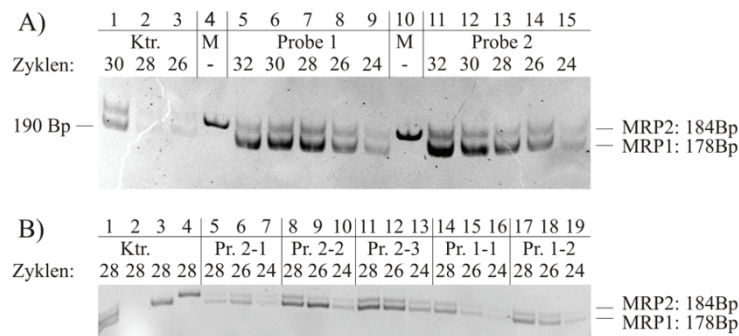


Abb. 22: Semiquantitative Bestimmung der Mengenverhältnisse von MRPR1 und MRPR2

A) Aus zwei Gesamt-RNA-Präparationen (5-9: Probe 1, 250 ng; 11-15: Probe 2, 355 ng) wurden MRP-cDNAs mit dem Primer 3'MRP-anti3 hergestellt. Die Amplifikation der cDNAs (24-32 Zyklen) wurde mit den Primern 5'MRP und 3'MRP-anti3 durchgeführt. Ktr (1-3): genomische DNA (1ng) aus *A. thaliana*. M: pUCMix8-Marker.

B) Für die Amplifikation in 24-28 Zyklen wurden Verdünnungen der in A) verwendeten cDNAs eingesetzt. 14-19: 1/5x Probe 1 (Pr. 1-1); 1/2x Probe 1 (Pr. 1-2); 5-13: 1/5x Probe 2 (Pr. 2-1); 1/2x Probe 2 (Pr. 2-2); 1x Probe 2 (Pr. 2-3); Ktr: 1: genomische DNA (1 ng) aus *A. thaliana*; 2: kein Templat; 3: pT7ATMRP1 (1 ng); 4: pT7ATMRP2 (1 ng)

4.2.2 Nachweis von RNase P/MRP RNAs durch Northern Blot

Um verschiedene pflanzliche RNase P/MRP RNAs *in vivo* nachzuweisen, wurden Präparationen von kleinen RNAs (3.1.7.2, Schön et al., 1989) aus Weizenkeimen, Gesamt-RNA und fraktionierte RNA aus Blattmaterial (3.1.7.3) von *Arabidopsis thaliana* in einem denaturierenden 8 % PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine positivisierte Nylonmembran geblottet (Abb. 23). Nach Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde 3'Plant-MRP-CRV-antiA (3.4.2) wurden in der Weizen-RNA zwei Banden (linker Pfeil, Spur 1 in Abb. 23) mit ähnlicher Größe wie die Kontroll-RNA (MRPR1-Transkript) detektiert. In der *A. thaliana*-RNA konnte in der R2/3-Fraktion (mittlerer Pfeil, Spur 3 in Abb. 23) nur ein schwaches Signal detektiert werden. Unter stringenteren Hybridisierungs- und Waschbedingungen konnte das Signal verstärkt werden, wodurch jedoch das Signal in der Weizen-RNA verschwindet. In unfraktionierter *A. thaliana* Gesamt-RNA konnten MRP RNAs nicht nachgewiesen werden.

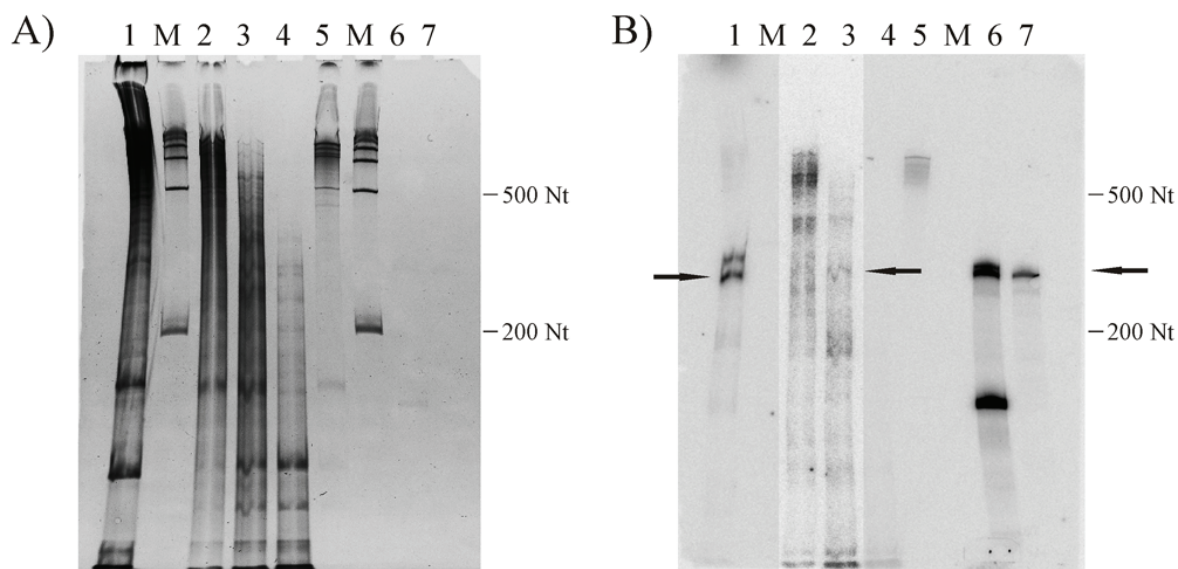


Abb. 23: Northern Blot Analyse von RNase P/MRP RNAs aus *A. thaliana* und Weizenkeim

A) denaturierendes 8 % PAA-Gel, EtBr-Färbung; B) Nylon-Membran, Autoradiografie nach Hybridisierung mit der Sonde Plant-MRP-CRV-antiA.

1: RNA aus Weizenkeimen (10 µg); 2: *Ath*-RNA (R3-Fraktion, 5 µg); 3: *Ath*-RNA (R2/3 Fraktion, 5 µg); 4: *Ath*-RNA (R2-Fraktion, 5 µg); 5: *Ath* Gesamt-RNA (1 µg); 6: je 20 ng MRPR1-Transkript (264 Nt, rechter Pfeil), MRPR1-2-Transkript (153 Nt); 7: 20 ng MRPR2-Transkript (268 Nt); M: RNA-Leiter (Fermentas, 1 µg). Wegen des schwachen Signals wurden die Spuren der Proben 2 und 3 gesondert kontrastiert dargestellt.

4.2.3 Bestimmung des 5'-Endes der RNase MRP RNAs

Für Strukturvorhersagen und Identifizierung der Transkriptionsstartstelle wurde das 5'-Ende der MRPRs mittels RACE-PCR bestimmt, wobei ursprünglich M-MuLV-RTase für die cDNA-Synthese eingesetzt wurde. Dabei zeigte die PCR-Analyse der Klone, dass mit den gewählten Primern zwei verschiedene Produkte amplifiziert wurden. Die Analyse der größeren Produkte enthielt nur cDNAs der MRPR2 inklusive Promotorregion. Die Sequenzierung der kürzeren Produkte zeigte, dass diese Proben nur die MRP1 Variante enthielten, die am 5'-Ende verkürzt ist. M-MuLV-RTase war nicht in der Lage, die Elongation über den P3-Loop der MRPR1 hinaus durchzuführen. Eine Wiederholung des Experiments mit AMV-RTase lieferte ausschließlich die komplette cDNA der MRPR1 mit dem reifen 5'-Ende. Anders als von Kiss et al. (1992) durch *primer extension* ermittelt, ist die RNA um 2 Nukleotide kürzer und beginnt mit 5'-AAUUGU statt mit 5'-ACAAUUGU. Ein weiterer Unterschied ist die Insertion einer Guanin-Base an Position 93, die in der Sequenz von Kiss et al. (1992) nicht vorkommt (siehe Abb. 20).



Die Sequenz der zweiten Variante MRP2 zeigt, dass die MRP2 *in vivo* mit der Promotorregion synthetisiert wird. USE: Promotorelement (*upstream sequence*), TATA: TATA-Box Promotorelement, MRP1 (Kiss) nach Kiss et al. (1992) annotierte MRP1, MRP2 (Picc.): nach Piccinelli et al. (2005) annotierte MRP2. MRP1 (RACE) bzw. MRP2 (RACE): die durch RACE-PCR ermittelten MRPRs; Chr. 3: die für MRPR1 kodierende Region auf dem Chromosom 3, Chr. 2: die für MRPR2 kodierende Region auf dem Chromosom 2.

4.2.4 Ribozymreaktion mit RNase MRP RNAs aus *A. thaliana*

Um zu überprüfen, ob die als MRP RNA annotierten RNAs möglicherweise RNase P Funktion besitzen, wurde ein Test auf Ribozymaktivität durchgeführt. Dazu wurden die Bedingungen nach Li et al., 2007 und Kikovska et al., 2007 verwendet (3.8.1) und modifiziert. Um die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens der RNAs zu erhöhen, wurde die Inkubationszeit von 4 h auf bis zu 22,5 h verlängert und die Menge der MRPR-Transkripte von 64 pmol auf 200 pmol erhöht. Zusätzlich wurde die Renaturierung der RNAs nach den Angaben von Li et al., 2007, Kikovska et al., 2007 und wie in 4.5.1 beschrieben durchgeführt. Um die Reaktion etwas zu beschleunigen, wurde der pH des MES-Puffers von 6,0 auf 6,1 erhöht. Die Reaktionen nach den Bedingungen von Li et al., 2007 bzw. Kikovska et al., 2007, sind in Abb. 25 dargestellt. Neben der Reaktion mit M1-RNA konnte bei keiner der Reaktionen ein Substratumsatz (reife tRNA) erzielt werden.

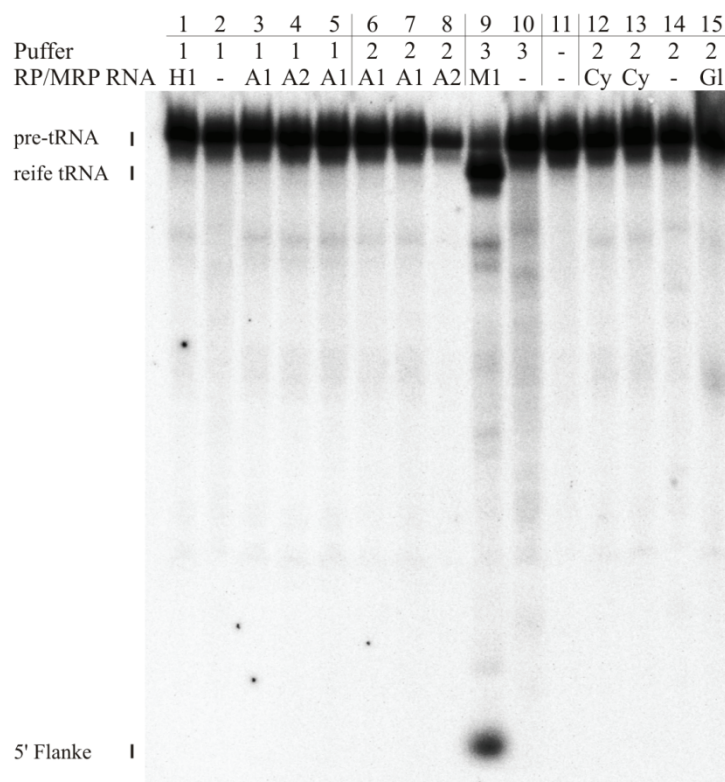


Abb. 25: Test auf Ribozymreaktion der MRP RNAs

Die RNAs wurden entsprechend nach Kikovska et al., 2007 (1-4), Li et al., 2007 (7, 8, 12 - 15) bzw. nach 4.5.1 (5, 6) vorbehandelt. Eingesetzt wurden je 100 pmol H1-RNA, MRPR1, MRPR2, CyRPR (12), 200 pmol CyRPR (13), 74 pmol GlauRPR aus (15), 450 fmol M1-RNA (9) und 305 fmol ^{32}P -markierte pre-tRNA^{Tyr}. Probe 11 enthält unbehandelte pre-tRNA^{Tyr} in TE-Puffer. Die Reaktionen wurden für 18 h bei 37 °C durchgeführt und auf ein 8 % PAA-Gel aufgetragen.

Bezeichnungen der RP/MRP RNAs: H1: H1-RNA aus *H. sapiens*, A1: MRPR1 aus *A. thaliana*, A2: MRPR2 aus *A. thaliana*, Cy: CyRPR aus *C. paradoxa*, Gl: GlauRPR aus *G. nostochinearum*, M1: M1-RNA aus *E. coli*.
Pufferbezeichnungen:

1: Kikovska-Puffer, 2: Li-Puffer, 3: Hochsalzpuffer (3.8.1)

4.3 Analyse der Genprodukte von *A. thaliana* RNase P/MRP-Proteingenen

Im Folgenden werden die in *A. thaliana* identifizierten RNase P/MRP-Homologe bzw. Proteine mit dem Präfix "At" bezeichnet: AtPOP1, AtRpp14, AtRpp29, AtRpp30 und AtRpp38. Proteine erhalten zusätzlich das Suffix "p": AtPOP1p, AtRpp14p usw. Abweichend hiervon haben die Oligonukleotide, die zur Amplifikation der Nukleinsäuren verwendet wurden, das Präfix "AT".

4.3.1 Analyse der Transkriptions- und Translationsprodukte von *AtPOP1*

4.3.1.1 Bestimmung des 3'-Terminus von *AtPOP1*-mRNA

Vorangegangene Untersuchungen in *A. thaliana* lieferten nur die mRNA eines kurzen POP1-Homologen mit zwei ungespleißten Exons, das in Exon I für ein 17 kDa großes Protein kodiert (Menzel, 2002; AC002337). Zwei weitere mRNA-Varianten wurden von Xiao et al. (2005a) identifiziert. Die erste kodiert für ein 92,5 kDa Protein (Abb. 26, Var 2; DQ069804, Anhang Abb. 86), das homolog zu POP1p in anderen Organismen ist. Wird diese mRNA (Abb. 26) in den Introns I und II alternativ gespleißt (DQ069805, Anhang Abb. 86), resultiert aus der Translation ein kurzes Protein (154 AS, 17,6 kDa), das nur COR I und COR II bzw. teilweise die POP1-Domäne enthält. Beginnt die Translation von einem Startcodon in Exon II (AUG 2 in Abb. 26), entsteht eine dritte annotierte POP1p-Variante (659 AS, 73,8 kDa) ohne COR I und COR II bzw. POP1-Domäne. Da alle in Eukaryoten bekannten POP1-Gene für Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa kodieren, sollte das 3'- und 5'-Ende der *AtPOP1*-mRNA bestimmt werden.

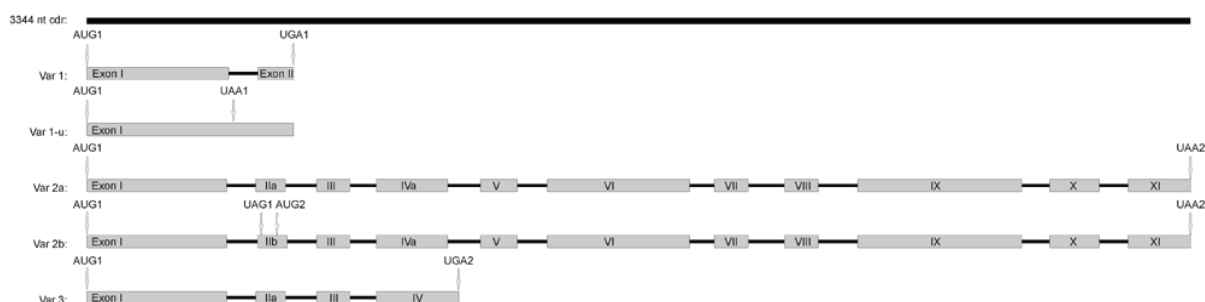


Abb. 26: Spleißvarianten der *AtPOP1*-mRNA

Übersicht der annotierten und identifizierten Spleißmuster von *AtPOP1*. cdr: *coding region*/kodierende Region zwischen ATG1 und TAA2 (3344 Bp); Var 1: Spleißvariante 1 von *AtPOP1* (573 Nt, Protein: 190 AS); Var1-u: ungespleißte Var 1 (668 Nt, Protein: 151 AS); Var 2a, 2b: Spleißvariante 2 von *AtPOP1* nach Xiao et al. (2005a) (2a: 2481 Nt, Protein 826 AS; 2b: 2483 Nt, Protein 659 AS); Var 3: Spleißvariante 3 (924 Nt, Protein: 307 AS); Exons sind in römischen Ziffern nummeriert, Introns sind als schwarze Linien dargestellt.

Ausgehend von *Ath*-mRNA wurde eine cDNA mit dem Anker2-Primer angefertigt und mit den Primerpaaren ATPOP1-F + Anker2, ATPOP1-GSP1 + UAP, ATPOP1-3'ss + UAP ampli-

fiziert. Die Produkte der letzten PCR hatten eine Länge von ca. 0,7-1 kBp; sie wurden über ein PCR Purification Kit gereinigt, mit pCR-XL-TOPO ligiert und die erhaltenen Klone durch Kolonie-PCR mit den Primern ATPOP1-GSP3F + M13rev auf Orientierung und Länge des Inserts getestet. Nur sechs von 55 Klonen zeigten Inserts mit den Längen 300 bzw. 600 Bp, wovon vier sequenziert wurden. Davon zeigte ein Klon mit dem kurzen Insert von 300 Bp eine Fehlpaarung des Anker2-Primers in einem Adenin-reichen Sequenzbereich. Die Klone mit Insertlänge 600 Bp zeigten alle die gleiche 3'-Sequenz (Abb. 27).

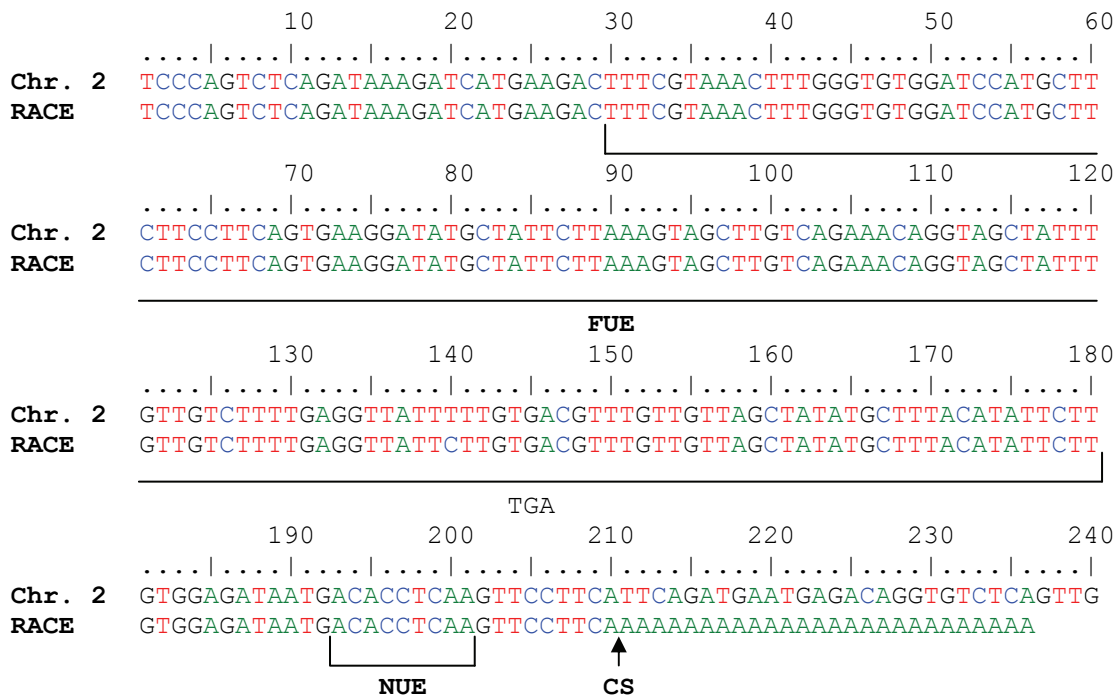


Abb. 27: Ermittlung der Polyadenylierungsstelle von AtPOP1

Die experimentell bestimmten 3'-Enden der cDNAs von AtPOP1-mRNA sind im Alignment mit der genomischen Region (Chr. 2) dargestellt. Die CS befindet sich 66 Nt stromabwärts des Stopcodons (TGA bei Position 144 im Alignment). FUE: *far upstream element*, Uridin-reiche Kontrollregion; NUE: *near upstream element*, Adenin-reiche Kontrollregion für die Polyadenylierung; CS: *cleavage site*, determiniert die unmittelbare Polyadenylierungsstelle.

Die Bestimmung des 3'-Endes der AtPOP1-mRNA ergab eine mRNA-Länge von 987 Nt vom Startcodon bis zur Spaltstelle der Polyadenylierung. Diese enthält im Gegensatz zur ursprünglichen Annotierung (Variante 1) zwei weitere Introns (Abb. 26). Das zweite Intron weicht mit den Grenzen GC-AG von der GU-AG-Konsensussequenz ab, wird aber durch den gleichen Weg gespleißt wie GU-AG-Introns (major splicing pathway, Wu und Krainer 1999). Der ORF kodiert für ein Protein von 307 AS (34,6 kDa). Die Polyadenylierungssignale der neuen AtPOP1-mRNA folgen dem Konsensus in Pflanzen (Loke et al., 2005; Ji et al., 2007). Die Polyadenylierungssignale FUE, NUE und die CS sind in Abb. 27 eingezeichnet. In den

untersuchten cDNAs wurde eine Spaltstelle identifiziert, die 64 Nt hinter dem Stopcodon lokalisiert ist.

4.3.1.2 Bestimmung des 5'-Terminus der AtPOP1-mRNA

Die in der Datenbank vorhandenen POP1-ESTs sind am 5'-Ende unterschiedlich lang; sie beginnen 39-264 Nt vor dem Translationsstart. Die Analyse der genomischen Sequenz mit FGENESH (softberry) legt den Transkriptionsstart 267 Nt vor das Startcodon der Translation. Um den tatsächlichen Transkriptionsstart festzulegen, wurde die Bestimmung des 5'-Endes mittels RACE durchgeführt. Die cDNA-Synthese wurde mit dem genspezifischen 3'-Primer ATPOP1-GSP6 durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde über Mikrofiltration gereinigt und für eine Polyadenylierung mittels Terminaler Transferase eingesetzt (3.4.4.3). Die anschließenden PCR-Zyklen mit den Primerpaaren ATPOP1-GSP7 + Anker2, ATPOP1-GSP9 + UAPkurz lieferten ein Produkt von ca. 800 Bp Länge, das mit pCRII-TOPO ligiert und anschließend sequenziert wurde.

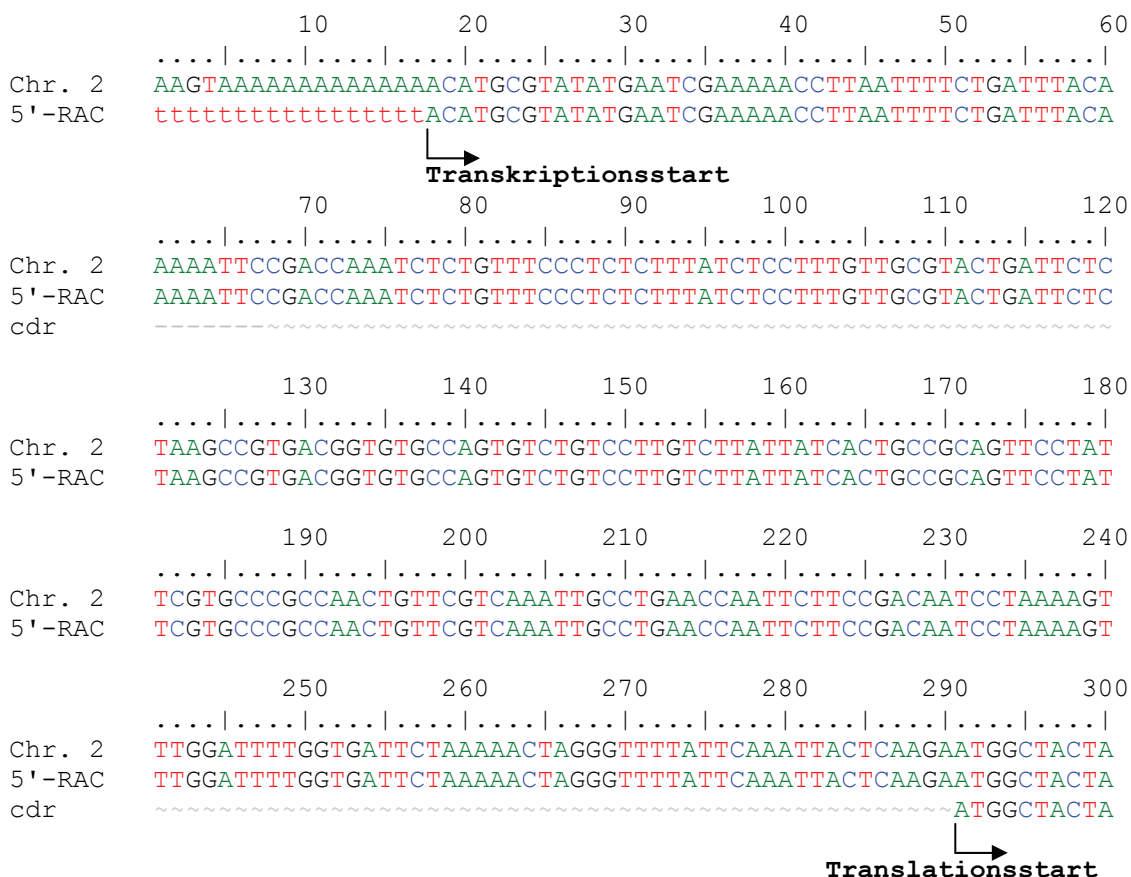


Abb. 28: Transkriptionsinitiationsstelle von AtPOP1-mRNA

Vergleich des durch RACE bestimmten 5'-Endes von AtPOP1-mRNA mit der genomischen Region; cdr: kodierende Region. Die untranslatierte Sequenz der AtPOP1-mRNA umfasst 273 Nt. Die durch Terminale Transferase an das 3'-Ende der cDNA (entspricht dem 5'-Ende der mRNA) addierte Tailingsequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt.

Die 5'-RACE-Analyse ergab eine 5'-untranslatierte Sequenz mit einer Länge von 273 Nt (Abb. 28, Anhang Abb. 86). Die Sequenzierung mehrerer Klone zeigte ein einheitliches Spleißmuster für das Intron I, das in allen Transkripten korrekt gespleißt wurde.

4.3.1.3 Nachweis von POP1-mRNA im Northern Blot

Für den Nachweis des AtPOP1-Transkriptes wurden RNA-Präparationen verwendet, bei denen die mRNA angereichert wurde (3.1.7.1). Als Kontrolle für das ursprünglich annotierte Intron IIa wurde ein *in vitro* Transkript verwendet, das die kodierende Sequenz von AtPOP1 vom AUG1 bis UGA2 (Abb. 26) enthält, das für das 34 kDa Protein kodiert. Als Kontrolle für das alternative Intron IIb wurde ein *antisense* Oligo kreiert, das zwei Bindestellen für die Sonde enthält. Diese und weitere Kontrollen wurden als Dot Blot auf die Membran aufgebracht. In einer angereicherten mRNA-Fraktion konnte im Northern Blot mit der spezifischen Oligonukleotid-Sonde ATPOP1-GSP15R (alternatives Intron IIb) eine Bande von ca. 1,2 kB nachgewiesen werden (Abb. 29 C, Spur 2, 3 und 4). Die Sonde für das ursprünglich annotierte Intron IIa detektiert eine Bande von ca. 1,2 kB und eine weitere Bande von ca. 3,0 kB.

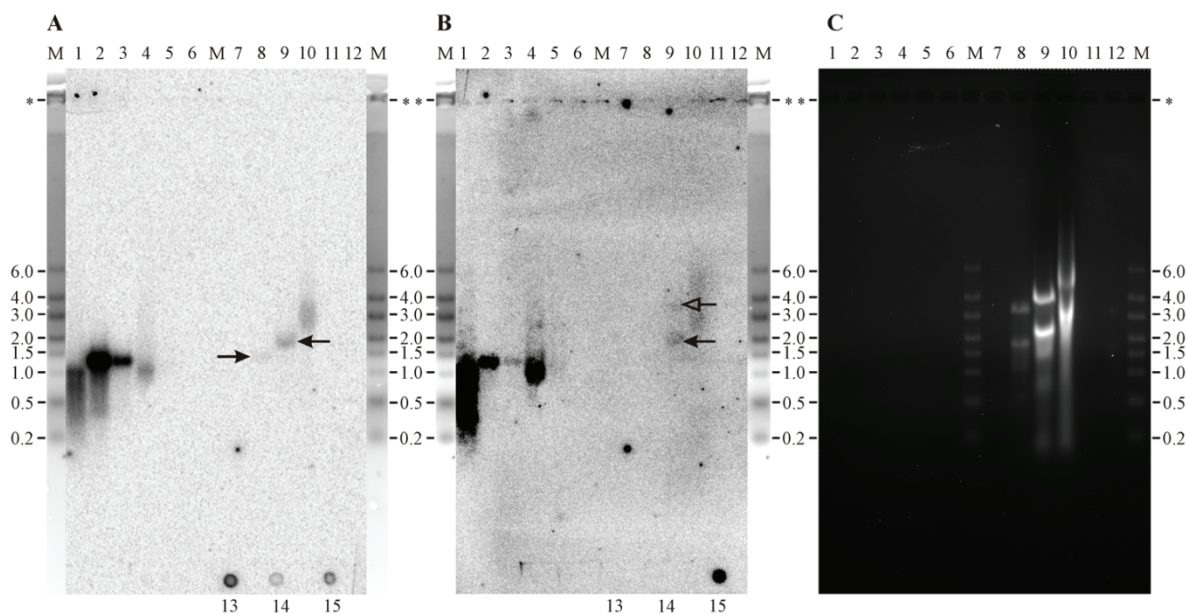


Abb. 29: Northern Blot Analyse der AtPOP1-mRNA

A) Autoradiografie nach Hybridisierung mit der AtPOP1-spezifischen Sonde ATPOP1-GSP15R.

B) Autoradiografie nach Hybridisierung mit der AtPOP1-spezifischen Sonde ATPOP1-GSP17R.

C) Denaturierendes 1 % Formaldehyd-Agarosegel vor dem Blot (Ethidiumbromidfärbung).

1: AtPOP1-Transkript (20 ng, 1095 Nt); 2: AtPOP1-Transkriptionstemplate (20 ng, 1112 Bp); 3: AtPOP1-Transkriptionstemplate (2 ng, 1112 Bp); 4: AtPOP1-Transkript (Gel gereinigt, 10 ng, 1095 Nt) ; 5: AtPOP1-Transkript (Gel gereinigt, 1 ng, 1095 Nt) ; 8-10: *A. thaliana*-mRNA angereicherte RNA (1, 10, 25 µg) ; 6, 7, 11, 12: Probenpuffer; 13, 14: ATPOP1-GSP15R-target (Intron IIb, 0,1 und 0,02 ng bzw. 7 und 1,4 fmol); 15: AtPOP1-Transkript (Intron IIa, 1 ng bzw. 2,8 fmol, 1095 Nt); M: Fermentas Ribo Ruler High Range; *-: Position der Geltaschen.

4.3.1.4 In silico-Analyse der Primärsequenz von AtPOP1p

Die von Xiao et al. (2006) beschriebenen konservierten Sequenzen COR I-IV können teilweise in AtPOP1p identifiziert werden (Tab. 4). Die beiden konservierten Sequenzabschnitte COR I (conserved region 1) und COR II, die als RNA-Bindedomäne gelten und auch als „POP1-Domäne“ festgelegt wurden, sind in AtPOP1p (307 AS; 34,6 kDa) sehr gut repräsentiert. Diese Sequenzabschnitte sind durch einen hohen Anteil konservierter Arginin- (COR I) bzw. Tryptophanreste und basischer Aminosäuren gekennzeichnet. Die beiden anderen annotierten konservierten Motive COR III (POPLD Domäne) und COR IV (G-Patch) konnten dagegen nur teilweise in der langen Variante von AtPOP1p (826 AS; 92,6 kDa, DQ69804) identifiziert werden. Für COR IV wurde eine globuläre Domänenstruktur vorhergesagt, die in verschiedenen RNA-prozessierenden Enzymen und RNA-Bindeproteinen (Aravind und Koonin, 1999) vorkommt und möglicherweise als Kontaktstelle zu anderen Proteinen dient.

Tab. 4: Vergleich der konservierten Regionen von hPOP1p und AtPOP1p

COR I	
<i>Sce</i>	89 FQ ALPRKL RRR TASHNVRRI PKR 111
<i>Hsa</i>	132 FQ TLPRHM RRR AMSHNVKRL PRR 154
<i>Ath</i>	52 FR SK-RNK RRR TNSYN NP AK KR 73
COR II	
<i>Sce</i>	233 RQ KHFAW LPT HIWNA KR SHMMKR WGY QM VWAPT QK CPKLTH RL GG 277
<i>Hsa</i>	195 RQ KKNI WLE THIW HAKR FHMVKK WGY CL GERPT VK SHRACY RAMT 239
<i>Ath</i>	117 SGDGT KRLR THV WHAKR F TM TKL WGF HL PLGLH GR GRGSRDVL KQ 161
COR III	
<i>Sce</i>	553 LKTRD W I VVLP WFWLLPL W HLLNRI PR MYHI GLRQ FQQIQYENKQLY FP DDY 602
<i>Hsa</i>	613 GWGS GW DVLL LP KGWGM AF WIPFIYRG-VRVG GLKE SAVHSQYKRS PNV PGDF 663
<i>Ath</i>	486 -APT GW SLI LPL SWIKVF WNA FVSKG-AHA IGQRE KRWVSCDDGL PFF PSDF 535
<i>Sce</i>	603 PFT QL GYIENSFYKKEASKTK WDR K PMGKR INFE- KIK DIHNTKLPAYS GEIG DFF 657
<i>Hsa</i>	664 PDC P AG -MLFAEEQAKN LLEKYK RRPPAKRPN YV- KL GT LAP FCCP WEQ L TQD WES 717
<i>Ath</i>	536 PD CK AY -SSFTLSEAAD LEEK AQ RRPPAIR PFRIPIPPWNSIHV TRS IGEGSNQK 590
COR IV	
<i>Sce</i>	820 LIG FITSGTY-----HLN CG NGMG IG FIDHHA AIR QPT-----RYV LIR NV 860
<i>Hsa</i>	963 LLG FVT QG DF-----SMAV GCGEALG FVSLTG LLD MLSSQ PAAQ RGLV LLR PP 1010
<i>Ath</i>	748 PIG FVT TG FVRGSKKPAAEAFCDAV LLG RLRDEQWRDKDVRRRKQ IYV LVRNL 801
<i>Sce</i>	861 GTNT YRL GEWSKIS 874
<i>Hsa</i>	1011 AS LQYR FA RIA IEV 1024
<i>Ath</i>	802 RSSA FRLA LAT IV L 815

Das Alignment basiert auf dem Vergleich mit Sequenzen verschiedener Organismen (Anhang Abb. 87). Die konservierten Aminosäuren sind fett gedruckt. Die neu identifizierte AtPOP1p-Sequenz umfasst 307 Aminosäuren. Die darüber hinaus gehende Sequenz ist Teil der annotierten AtPOP1p-Variante (Xiao et al. 2005a), und ist für den formalen Vergleich mit COR III und COR IV dargestellt. Die im Text beschriebenen Aminosäuren, die einen Einfluss auf die Funktion ausüben, sind unterstrichen.

Von den Aminosäuren, die für die tRNA-Prozessierung in Hefe-RNase P essentiell sind, können einige in AtPOP1p identifiziert werden. Weitere für die RNase MRP Funktion wichtige Aminosäuren sind ebenfalls in AtPOP1p repräsentiert. Diese sind in Tab. 4 durch Unterstreichung kenntlich gemacht und unterstreichen die nahe Verwandtschaft zu den Homologen aus Mensch und Hefe.

4.3.2 Analyse der Transkriptions- und Translationsprodukte von AtRpp30

4.3.2.1 Klonierung der AtRpp30-mRNA und Analyse des Spleißmusters

Eine zum zentralen RNase P Protein Rpp1 aus Hefe bzw. dem menschlichen Rpp30 homologe Sequenz konnte auch in *A. thaliana* identifiziert werden. Um dieses Proteingen zu klonieren, wurde ausgehend von der cDNA einer mRNA-Präparation mit dem Primerpaar ATRpp30F und ATRpp30R ein ca. 1750 Bp langes PCR-Produkt amplifiziert und in einen SmaI-linearisierten pUC19-Vektor ligiert. Nach Verifizierung der Sequenz diente diese Plasmidpräparation als Matrize für eine PCR mit den Primern ATRpp30F-XhoI und ATRpp30R-HindIII. Das PCR-Produkt wurde mit XhoI und HindIII geschnitten und mit dem entsprechend linearisierten Expressionsvektor pRSET-A ligiert.

Die Sequenzanalyse zeigte ein neues Spleißmuster der AtRpp30-mRNA. Ein in der Datenbank annotiertes, aber in dieser cDNA nicht gespleißtes Intron kurz vor dem 3'-Ende der bekannten Sequenz (Intron V) bewirkt eine Rasterverschiebung, die das annotierte UAG-Terminationscodon in Exon VI eliminiert. Die erhaltene Sequenz ist somit eine am 3'-Ende verkürzte Variante von AtRpp30 und wird im Folgenden als AtRpp30-0 bezeichnet (Abb. 30). Das klonierte AtRpp30-0 enthält kein Stopcodon in der ermittelten Sequenz. Durch Klonierung in pRSET-A entsteht ein Fusionsprotein (669 AS, 73,7 kDa) aus den Aminosäuren 2-607 von AtRpp30 und den N-terminalen Aminosäuren des Vektors (6 x His u.a.), sowie einigen zusätzlichen vektorkodierten Aminosäuren am C-Terminus bis zum *in frame*-Stopcodon im Expressionsvektor. Dieser Klon wurde zur Expression gebracht, das Protein gereinigt und für die Produktion von Antikörpern und für Bindungsversuche verwendet.

4.3.2.2 Bestimmung des 3'-Terminus der AtRpp30-mRNA

Da die erste Klonierung von AtRpp30 eine verkürzte Variante ergab, wurde eine erneute *in silico*-Analyse der AtRpp30-Gensequenz durchgeführt. Diese zeigte, dass vermutlich ein weiteres Intron (Intron VI) in dem Genabschnitt inseriert ist. Zur Bestimmung des tatsächlichen 3'-Endes der Sequenz wurde deshalb eine 3'-RACE durchgeführt.

Als Matrize für die RACE-PCR diente eine mit dem Anker2-Primer hergestellte cDNA. Die Amplifikation der AtRpp30-Sequenz wurde in mehreren aufeinanderfolgenden Amplifikationen mit den 5'-Primern ATRpp30F, ATRpp30GSP1, ATRpp30GSP3, ATRpp30GSP4 und dem 3'-Primer UAP durchgeführt. Nach der letzten PCR wurden Produkte von ca. 600-900 Bp Länge erhalten. Nach Ligation mit pCRII-TOPO wurde durch Kolonie-PCR mit dem Primerpaar ATRpp30GSP4 + ATRpp30R auf das Vorkommen des Introns V überprüft und Plasmidpräparationen der Klone angefertigt (3.1.5.1). Es zeigte sich eine Verteilung der Amplifikate auf 27 % ungespleißte (287 Bp) und 73 % gespleißte (211 Bp) cDNAs. Eine weitere PCR mit dem Primerpaar ATRpp30GSP4 + Anker2 zeigte, dass die Länge der klonierten Transkripte von 400 Bp bis 800 Bp variiert. In acht sequenzierten Proben konnten insgesamt drei Spleißisoformen in Bezug auf Intron V bestimmt werden, die in Abb. 30 dargestellt sind. Die Konsequenz des differentiellen Spleißmusters ist die Verschiebung des Stopcodons. Spleißvariante 2 und 3 enthalten ein Stopcodon, das im Vergleich zur Variante 1 um 392 Bp zum 3'-Ende hin verschoben ist. Daraus resultieren drei unterschiedlich lange Proteine (Sequenzen im Anhang Abb. 89): AtRpp30-1p (581 AS; 64,1 kDa), AtRpp30-2p (678 AS; 75,3 kDa), AtRpp30-3p (705 AS; 79,3 kDa).

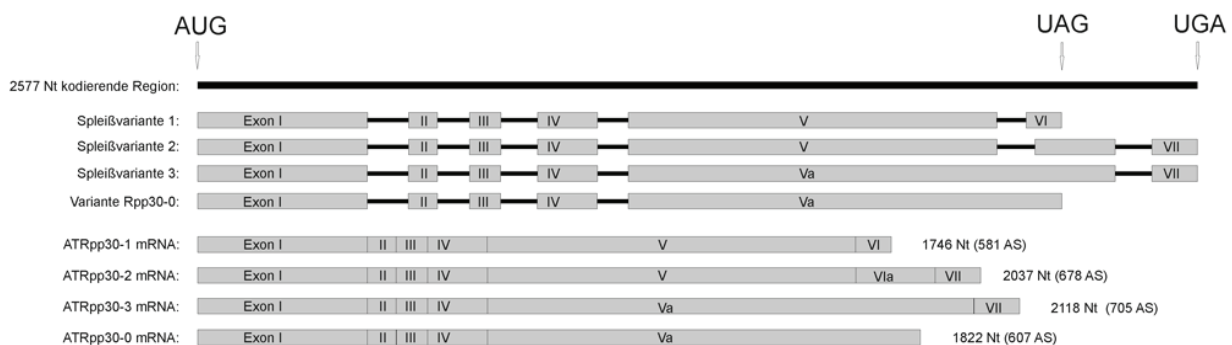


Abb. 30: Spleißschema der AtRpp30-mRNAs

Schematische Darstellung der drei Spleißvarianten und der gespleißten mRNAs (rot) vom Startcodon bis zu den Stopcodons. Durch differentielles Spleißen wird das Intron V verlängert bzw. nicht gespleißt. Exons sind mit römischen Ziffern nummeriert. Nur die Variante AtRpp30-0 enthält innerhalb der klonierten Region kein Stopcodon. Die Sequenzen der Spleißvarianten befinden sich im Anhang (Abb. 88).

Stromabwärts des Introns V befindet sich ein weiteres bisher nicht identifiziertes Intron (VI), das in allen cDNAs herausgespleißt wurde. Die Sequenzanalyse zeigt außerdem drei Polyadenylierungsstellen (Abb. 31 A), die dem Konsensus in Pflanzen folgen (Loke et al., 2005; Ji et al., 2007). Die Polyadenylierungssignale FUE, NUE und die Schnittstelle (CS, *cleavage site*) sind in Abb. 31 A dargestellt. Die Schnittstelle wird an drei Stellen mit unterschiedlicher Sequenz kodiert (CS 1: UA; CS 2: UC; CS 3: UU).

4.3.2.3 Bestimmung des 5'-Terminus der *AtRpp30*-mRNA

Aufgrund der erhaltenen Spleißvariationen am 3'-Ende wurde das 5'-Ende der *AtRpp30*-Transkripte ermittelt, um die bisher identifizierten Exons zu verifizieren. Dazu wurde eine Reverse Transkription mit dem genspezifischen 3'-Primer ATRpp30R und *A. thaliana* Gesamt-RNA als Templat durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde für eine Polyadenylierung mittels Terminaler Transferase eingesetzt (3.4.4.3). Die PCR-Zyklen mit den Primerpaaren ATRpp30-R + Anker2, ATRpp30-GSP2 + UAP, ATRpp30-GSP5 + UAP lieferten ein Produkt von ca. 670 Bp Länge, das mit pCRII-TOPO ligiert wurde. Die Sequenzierung mehrerer Klone zeigte ein einheitliches Spleißmuster für die Introns I-IV. In allen Transkripten wurde eine 5'-untranslatierte Sequenz identifiziert. Der Transkriptionsstart liegt demnach 74 Bp stromaufwärts des AUG (Abb. 31 B). Aufgrund der Ergebnisse der 3'- und 5'-RACE Experimente wurden die drei *AtRpp30* Varianten in den Expressionsvektor pRSET-A kloniert, um sie für Funktionsuntersuchungen einzusetzen.

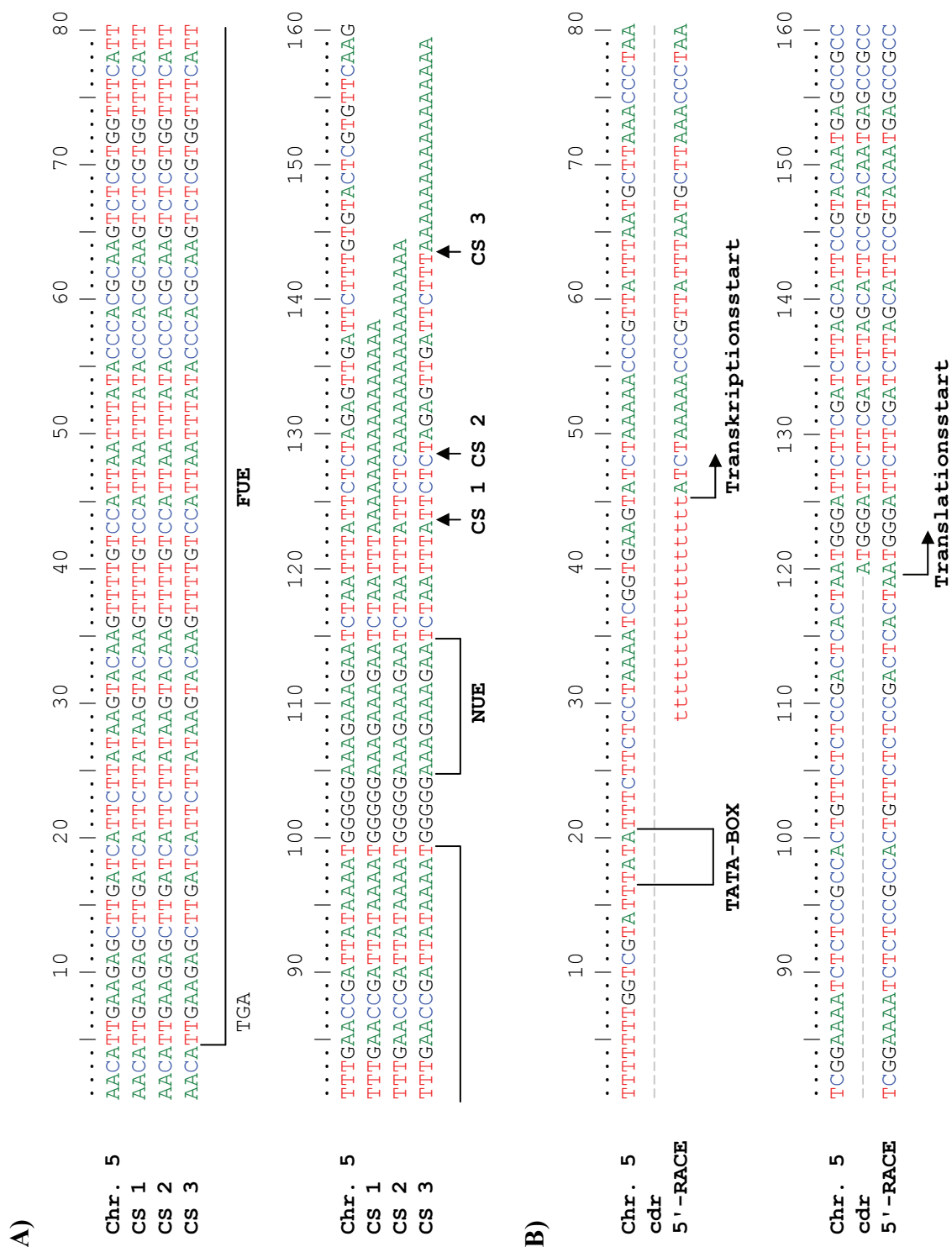


Abb. 31: Transkriptionsinitiations- und Polyadenylierungsstellen der AtRpp30-mRNAs

A) Sequenzalignment der experimentell identifizierten 3'-Enden von AtRpp30-mRNAs mit der genomischen Region (Chr. 5). FUE: *far upstream element*, Uridin-reiche Kontrollregion; NUE: *near upstream element*, Adenin-reiche Kontrollregion für die Polyadenylierung; CS: *cleavage site*, determiniert die unmittelbare Polyadenylierungsstelle. Das Stopcodon TGA von AtRpp30-3p befindet sich an Position 6 im Alignment.

B) Vergleich des durch RACE bestimmten 5'-Endes von AtRpp30-mRNA mit der genomischen Region; cdr: kodierende Region. TATA-Box und Transkriptions- sowie Translationsstartpunkte sind eingezeichnet. Die durch *tailing* generierte 5'-Sequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt.

4.3.2.4 *In silico*-Analyse der Sequenz- und Strukturhomologien von AtRpp30p

Ein Sequenzvergleich von AtRpp30p mit anderen bekannten und mit dem kristallisierten Rpp30-Homologen aus *Pyrococcus horikoshii* (Ph1877p, pdb: 1V77, Takagi et al., 2004) weist folgende Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf (Abb. 32): Die für die RNase P-Reaktion im Archaeobakterium *Pyrococcus horikoshii* (*Pho*) essentiellen Aminosäuren R₉₀ (D₁₃₈ in *Ath*, H₁₁₄ in *Homo sapiens*), R₁₀₇ (K₁₅₆ in *Ath*, K₁₃₂ in *Hsa*), K₁₂₃ (R₁₇₂ in *Ath*, R₁₄₈ in *Hsa*), R₁₇₆ (R₂₂₂ in *Ath*, R₁₉₈ in *Hsa*) und K₁₉₆ (R₂₄₂ in *Ath*, K₂₁₈ in *Hsa*) sind nur teilweise identisch, werden aber meist durch ähnliche ersetzt. Eine Ausnahme bildet R₉₀ (*Pho*) bzw. D₁₃₈ (*Ath*), das in *Hsa* und anderen Säugern durch Histidin ersetzt ist. Andere hochkonservierte saure Aminosäuren, die in Hefe-RNase P vermutlich der Metallionen-Koordination dienen (D₄, D₁₂₇, E₁₅₇; Dlakić 2005), sind auch in AtRpp30p (D₅, D₁₄₇, E₁₇₇) zu finden. Der Vergleich von AtRpp30p mit DRpp30p aus *D. discoideum*, dessen Struktur durch Homologie-Modellierung entstand, bestätigen die Merkmale (Vourekas et al., 2007). Die hohe Sequenzähnlichkeit zu Rpp30p aus anderen Organismen bestärkt die Identifikation als RNase P Protein. Strukturell betrachtet ist AtRpp30p ebenso wie Ph1877p in der Lage, die Sekundär- und Tertiärstruktur eines TIM-Barrels auszubilden. Eine große Auffälligkeit von AtRpp30p ist der stark verlängerte C-Terminus mit einem hohen Anteil an sauren Aminosäuren (D und E). Dieser Teil macht das Protein zum größten unter allen bekannten Homologen. Für diesen Teil ist keine Sekundärstrukturvorhersage möglich. Die Analyse der Primärsequenz lässt darauf schließen, dass das Protein besonders in diesem Bereich durch zahlreiche Phosphorylierungen (Tab. 6) modifiziert wird.

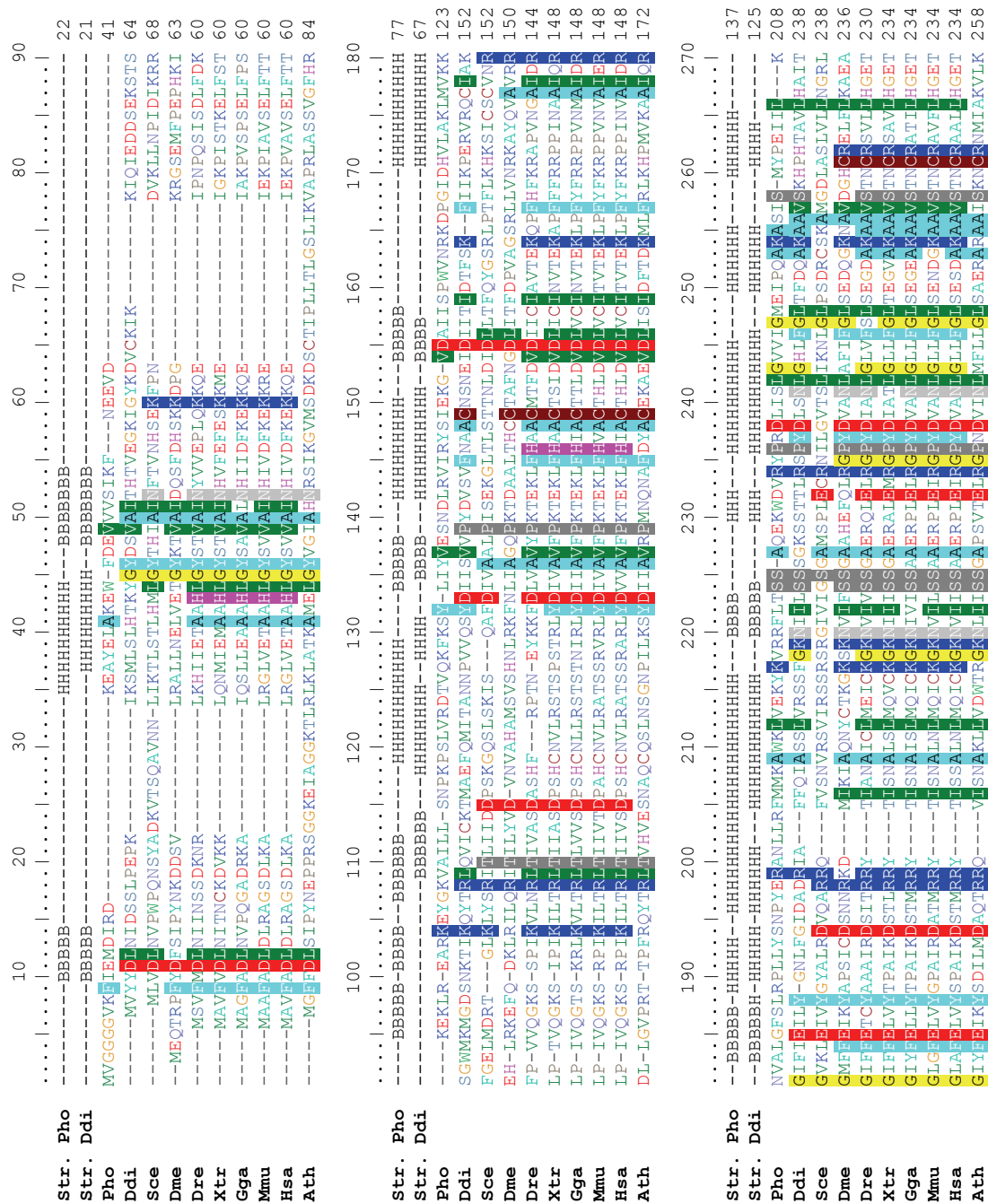


Abb. 32: Sequenzalignment von AtRpp30p mit bekannten Rpp30-Homologen

Für das Alignment wurden nur die ersten 258 AS von AtRpp30p verwendet, da sie die Homologien zu den bekannten Rpp30-Proteinen enthalten und dieser Teil in allen drei Spleißvarianten von AtRpp30p identisch ist (vollständige Sequenzen siehe Anhang Abb. 89). Sequenzidentitäten über 80 % sind farbschattiert und die Strukturelemente α -Helix (H) und β -Faltblatt (B) sind in den oberen Zeilen angegeben. *Str. Pho*: die Struktur von Rpp30p aus *Pho* ist durch Röntgenkristallstruktur-Analysen aufgeklärt worden; *Str. Ddi*: die Struktur von Rpp30p aus *Ddi* entstand durch Homologie-abhängige Modellierung; *Pho*: *Pyrococcus horikoshii*; *Ddi*: *Dictyostelium discoideum*; *Sce*: *Saccharomyces cerevisiae*; *Dme*: *Drosophila melanogaster*; *Dre*: *Danio rerio*; *Xtr*: *Xenopus tropicalis*; *Gga*: *Gallus gallus*; *Mmu*: *Mus musculus*; *Hsa*: *Homo sapiens*.

4.3.3 Analyse der Transkriptions- und Translationsprodukte von *AtRpp38*

4.3.3.1 Bestimmung des 3'-Terminus der *AtRpp38*-mRNAs

Für die *AtRpp38*-mRNA konnte im Rahmen der Expressionsklonierung nur ein Spleißmuster identifiziert werden (Dahl, 2003). Der translatierte Bereich der *AtRpp38*-mRNA umfasst 504 Nt (Abb. 33).

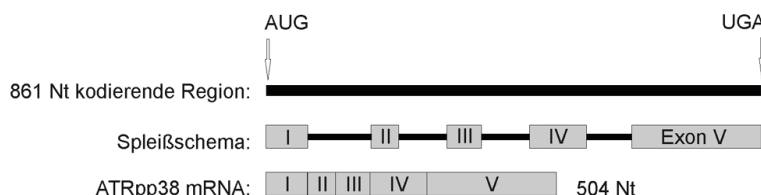


Abb. 33: Spleißschema der *AtRpp38*-mRNA

Die 504 Nt lange *AtRpp38*-mRNA kodiert für ein 167 AS Protein (18,7 kDa).

Das native 3'-Ende der *Rpp38*-mRNA wurde durch RACE aus der unter 4.3.1 angefertigten cDNA-Präparation ermittelt. Die geschachtelte Amplifikation erfolgte nacheinander mit den Primern ATRpp38-F + Anker2, ATRpp38-seqfor + UAP, ATRpp38-GSP1F + UAP. Das Amplifikat von ca. 500 Bp Länge wurde mit pCRII-TOPO ligiert. Die erhaltenen Klone wurden durch Kolonie-PCR mit den Primern ATRpp38-GSP1F + M13rev bezüglich der Länge und Orientierung des Inserts getestet. Von 13 Klonen hatten alle die gleiche Produktlänge von ca. 600 Bp inklusive Insert und *multiple cloning site*. Sechs dieser Klone wurden sequenziert. Dabei konnten vier verschiedene *cleavage sites* (CS) ermittelt werden (Abb. 34). Die Polyadenylierungssignale FUE, NUE und die U-reiche Region vor der CS, sowie die CS enthalten die unter 4.3.1 beschriebenen Merkmale. Auffällig ist die alternative CS4, die mit einem Abstand von 125 Nt sehr weit von der NUE entfernt lokalisiert ist.

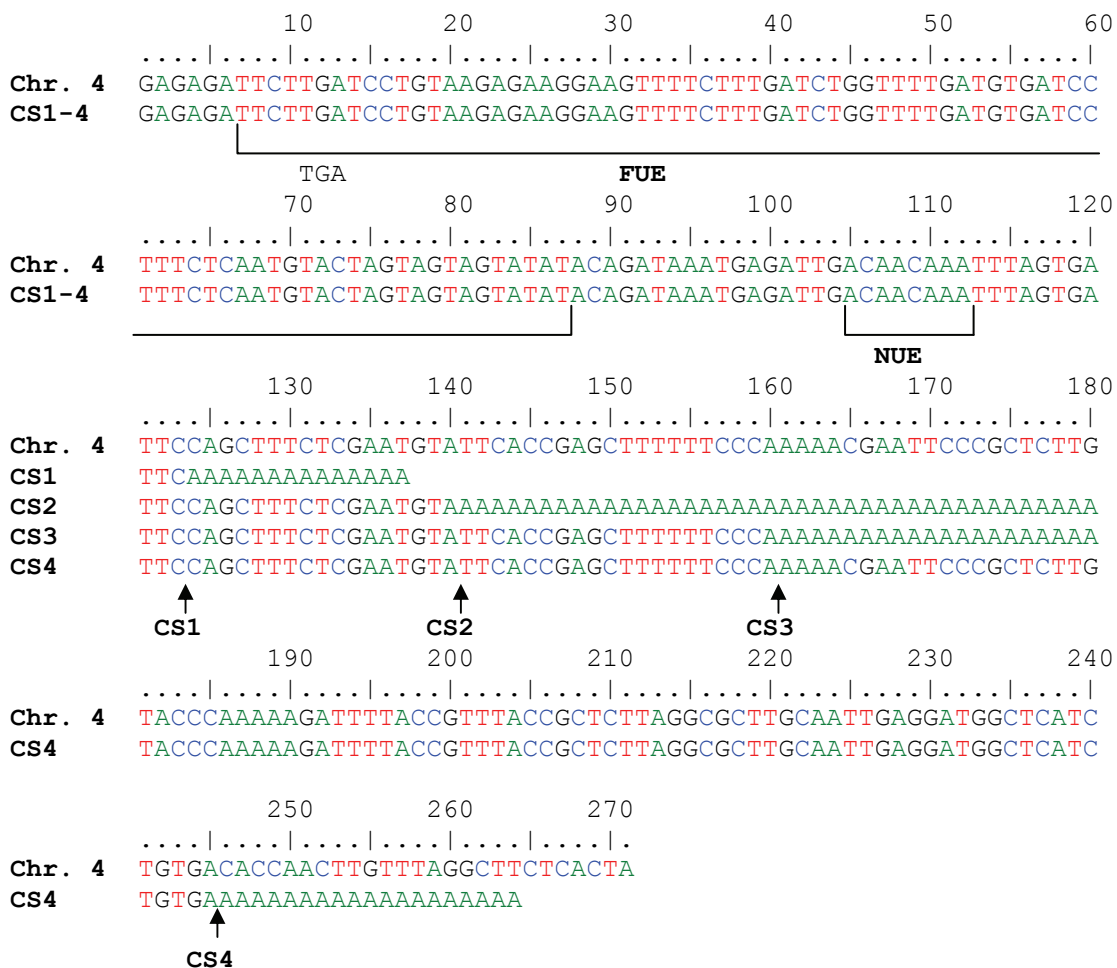


Abb. 34: Polyadenylierungsstellen von AtRpp38

Die experimentell bestimmten 3'-Enden der cDNAs von AtRpp38-mRNA sind im Alignment mit der genomischen Region (Chr. 4) dargestellt. Die CS 1-4 befinden sich 110, 127, 147 bzw. 232 Nt stromabwärts des Stopcodons (TGA an Position 11 im Alignment). FUE: *far upstream element*, Uridin-reiche Kontrollregion; NUE: *near upstream element*, Adenin-reiche Kontrollregion für die Polyadenylierung; CS: *cleavage site*, determiniert die unmittelbare Polyadenylierungsstelle. Die vollständige AtRpp38-Sequenz befindet sich im Anhang (Abb. 90).

4.3.4 Analyse der Transkriptions- und Translationsprodukte von AtRpp29

4.3.4.1 Bestimmung des 3'-Terminus der AtRpp29-mRNA

Die Experimente zur Klonierung von AtRpp29 für die heterologe Expression zeigten ein eindeutiges Spleißmuster ohne alternative Spleißisoformen (Krehan, 2004). Der kodierende Abschnitt der AtRpp29-mRNA hat eine Länge von 891 Nt (Abb. 35, Variante 2) und kodiert für ein Protein mit 296 AS. Im Unterschied zu einer alternativen, annotierten mRNA-Sequenz von MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences, Accession: B84863; Variante 1 in Abb. 35) wird Exon V durch alternatives Spleißen verkürzt. Zwei weitere Exons schließen sich an Exon V an. Da diese drei Exons in Spleißvariante 2 zusammen kürzer sind als Exon V und VI der Spleißvariante 1, ist die kodierende Sequenz der mRNA von Rpp29 mit 891 Nt

kürzer als die alternative Sequenz mit 930 Nt. Diese Diskrepanz sollte durch RACE-Analyse geklärt werden.

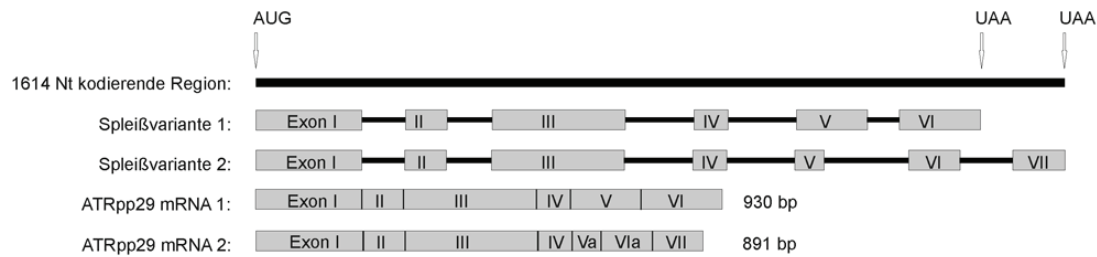


Abb. 35: Spleißvarianten der AtRpp29-mRNA

Von beiden annotierten Spleißisoformen konnte nur die Spleißvariante 2 verifiziert werden (Krehan, 2004). Diese kodiert für ein 296 AS Protein (33,3 kDa).

Für die Bestimmung des 3'-Endes der AtRpp29-mRNA wurde aus *A. thaliana*-mRNA eine cDNA mit dem Anker2-Primer angefertigt und anschließend in drei geschachtelten PCRs mit den Primerpaaren ATRpp29-F + Anker2, ATRpp29-GSP1 + UAP, ATRpp29-GSP3F + UAP ein Produkt von ca. 500 Bp amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in pCRII-TOPO kloniert und die Klonen durch Kolonie-PCR mit dem Primerpaar ATRpp29-GSP3F + M13rev auf das Vorhandensein der AtRpp29-cDNA getestet. Von 13 positiven Klonen mit der gleichen Produktlänge von ca. 750 Bp (Insert und *multiple cloning site*), wurden fünf sequenziert. Dabei konnten drei Polyadenylierungsstellen identifiziert werden. In Abb. 36 ist die 3'-untranslatierte Sequenz von AtRpp29-mRNA dargestellt. Auch hier sind die Polyadenylierungssignale FUE, NUE und die U-reiche Region vor der CS gut definiert. Die alternative *cleavage site* CS2 befindet sich hinter dem Dinukleotid A₂A₋₁, die alternative *cleavage site* CS3 befindet sich hinter dem Dinukleotid G₂A₋₁. Die Ergebnisse bestätigen die Spleißvariante 2 (Abb. 35).

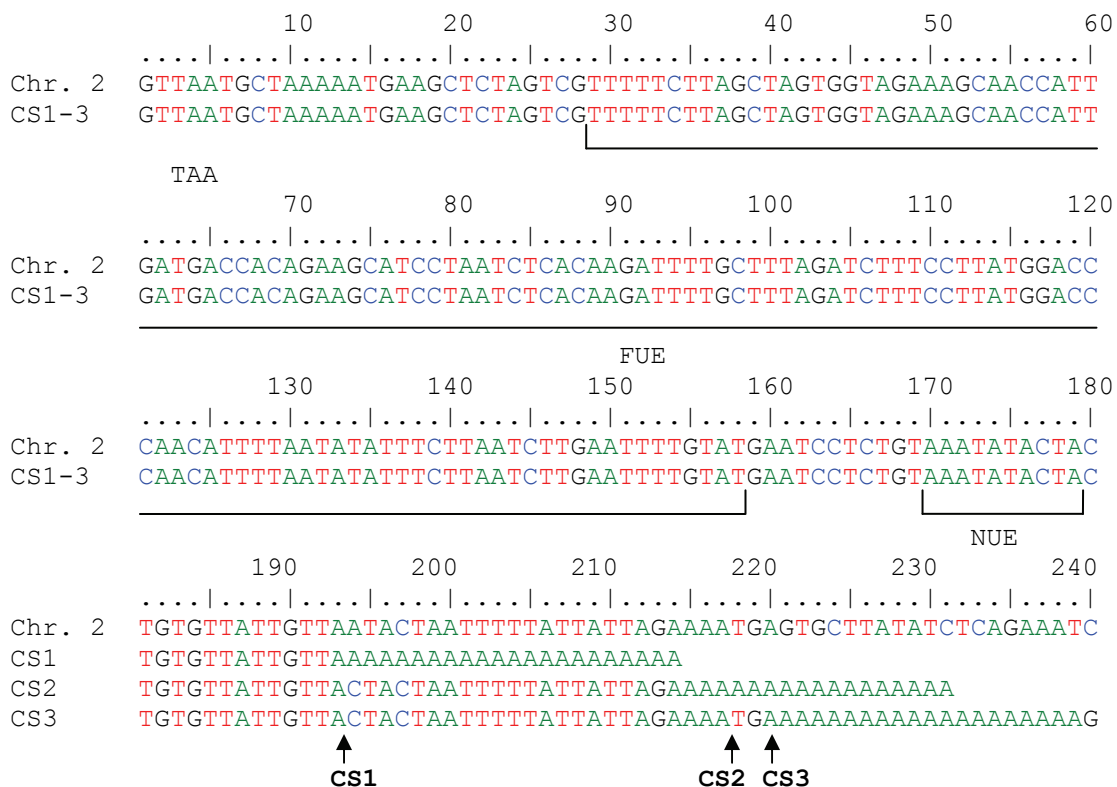


Abb. 36: Polyadenylierungsstellen von AtRpp29

Dargestellt sind die experimentell identifizierten 3'-Termini der AtRpp29-cDNAs und die genomische Region (Chr. 2). CS1, CS2 bzw. CS3 befinden sich 188, 212 bzw. 215 Nt stromabwärts des Stopcodons (an Position 3 im Alignment). FUE: far upstream element, Uridin-reiche Kontrollregion; NUE: near upstream element, Adenin-reiche Kontrollregion für die Polyadenylierung; CS: cleavage site, determiniert die unmittelbare Polyadenylierungsstelle.

4.3.4.2 Nachweis der AtRpp29-mRNA durch Northern Blot

Für den Nachweis des AtRpp29-Transkripts wurden zwei verschiedene mRNA-Präparationen (3.1.7.1) mit unterschiedlichem rRNA-Anteil verwendet. Die RNA wurde auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und durch Kapillarblot auf eine positivisierte Nylon-Membran übertragen (3.4.2.3). In einer angereicherten mRNA-Fraktion konnte im Northern Blot mit der spezifischen Sonde ATRpp29-GSP2R eine Bande von ca. 0,9-1,0 kB nachgewiesen werden (Abb. 37 C, Spur 2, 3 und 4). Dies entspricht der Länge der in der cDNA gefundenen Variante (891 nt kodierende Sequenz + 215 Nt 3'-UTR).

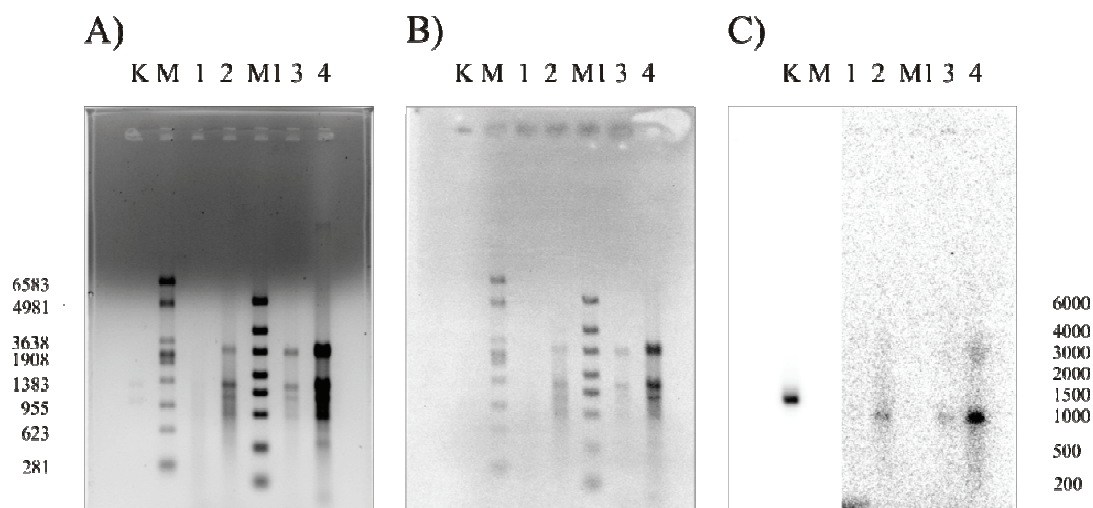


Abb. 37: Northern Blot Analyse der AtRpp29-mRNA

A) Auftrennung von zwei verschiedenen mRNA-Präparationen auf einem denaturierenden 1 % Formaldehyd-Agarosegel (Ethidiumbromidfärbung).

B) Ethidiumbromidfärbung der Nylonmembran nach dem Transfer.

C) Autoradiografie nach Hybridisierung mit der AtRpp29-spezifischen Sonde ATRpp29-GSP2R. Die linke Seite mit der Kontroll-RNA wurde wegen des starken Signals gesondert kontrastiert. Als Positivkontrolle diente ein AtRpp29-Transkript mit 995 Nt Länge.

1: mRNA 1-2 (0,29 µg)

2: mRNA 1-1 (1,8 µg)

3: mRNA 2-2 (0,257 µg)

4: mRNA 2-1 (1,9 µg)

K: T7-Transkripte von AtRpp30-cDNA (1548 Nt)

und AtRpp29-cDNA (995 Nt) in pRSET-A, je 10 ng

M: RNA Leiter Promega

M1: RNA Leiter Fermentas

4.4 Präparation der rekombinanten RNase P/MRP Proteine aus *A. thaliana*

4.4.1 Proteinisolierung durch Ni^{2+} -Affinitätschromatografie

Zur Isolierung rekombinanter Proteine aus dem Lysat exprimierender *E. coli*-Zellen wurde für alle *Ath* RNase P/MRP Proteine die Affinitätschromatografie mittels Nickel-Sepharose (3.6.3.5) verwendet. So wurden bisher AtRpp29p und AtRpp14p mit dieser Methode erfolgreich aus dem Proteinhomogenat transformierter *E. coli*-Zellen isoliert (Krehan, 2004; Braun, 2007). Da jedes dieser Proteine andere Eigenschaften besitzt, müssen die Reinigungsbedingungen neu angepasst werden.

4.4.2 Präparative Reinigung von AtPOP1p

Zur Herstellung des Proteins AtPOP1p (Spleißvariante 1, Abb. 26) wurde *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS mit dem Expressionsvektor pRSET-ATPOP1 transformiert, der Exon I von AtPOP1 mit einer N-terminalen His₆-Affinitätsmarkierung unter Kontrolle des T7-Promotors enthält (Menzel, 2002). Das rekombinante Protein AtPOP1p wurde in diesem System heterolog überexprimiert und durch Affinitätschromatografie an Nickel-Sepharose gereinigt, um es für funktionelle Studien zu verwenden. Wie in Abb. 38 und Abb. 39

erkennbar ist, eluiert schon ein beträchtlicher Teil während der Renaturierung auf der Säule (Fraktion 20-39). In dieser ersten Fraktion wurden ca. 6,35 mg des Proteins von der Säule gelöst, während durch die folgende Elution mit Imidazol noch 3 mg reines Protein erhalten wurde. Aus 200 ml Kultur (2 h Expressionsdauer) konnten so ca. 9 mg des rekombinanten Proteins isoliert werden.

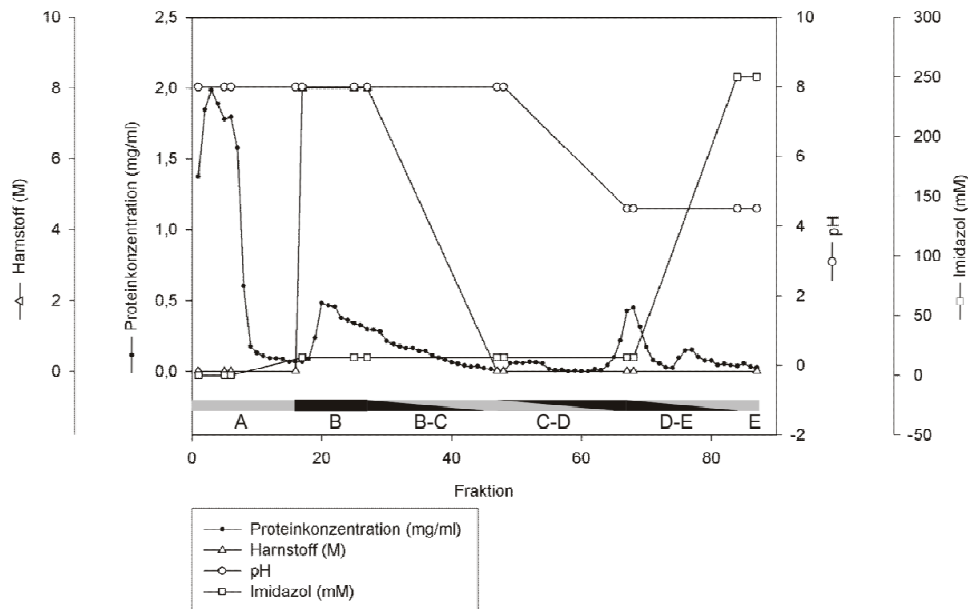


Abb. 38: Elutionsprofil der Affinitätschromatografie von rekombinantem AtPOP1p

Das Lysat von 0,2 L Kultur wurde mit 2 ml Ni-NTA-Agarose über Nacht inkubiert. Der Wechsel der Puffer B, C und D wurde jeweils im kontinuierlichen Gradienten durchgeführt. Das rekombinante Protein wurde in zwei Schritten von der Matrix eluiert: ein beträchtlicher Teil löst sich während der Renaturierung, die zweite Fraktion wird durch Einstellen des pH-Wertes auf pH 4,5 eluiert. Mit 250 mM Imidazol werden die restlichen noch gebundenen Proteine von der Säule eluiert. Fraktionsgröße: 1,5 ml.

Das rekombinante AtPOP1p (Spleißvariante 1, Abb. 26) hat ein theoretisches Molekulargewicht von 21,4 kDa (17,3 kDa ohne His₆-Tag), das im SDS-Gel (18 %) bestätigt wird. In Gelen mit niedrigerer Konzentration (13 %) zeigt es das Laufverhalten eines 23 kDa-Proteins. Das chromatografisch aufgereinigte Protein war nach Entfernung der Affinitätsmarkierung durch Enterokinase und anschließender elektrophoretischer Isolierung zur Antikörperproduktion in Kaninchen verwendet worden (Menzel, 2002), um immunologische Nachweisverfahren durchführen zu können.

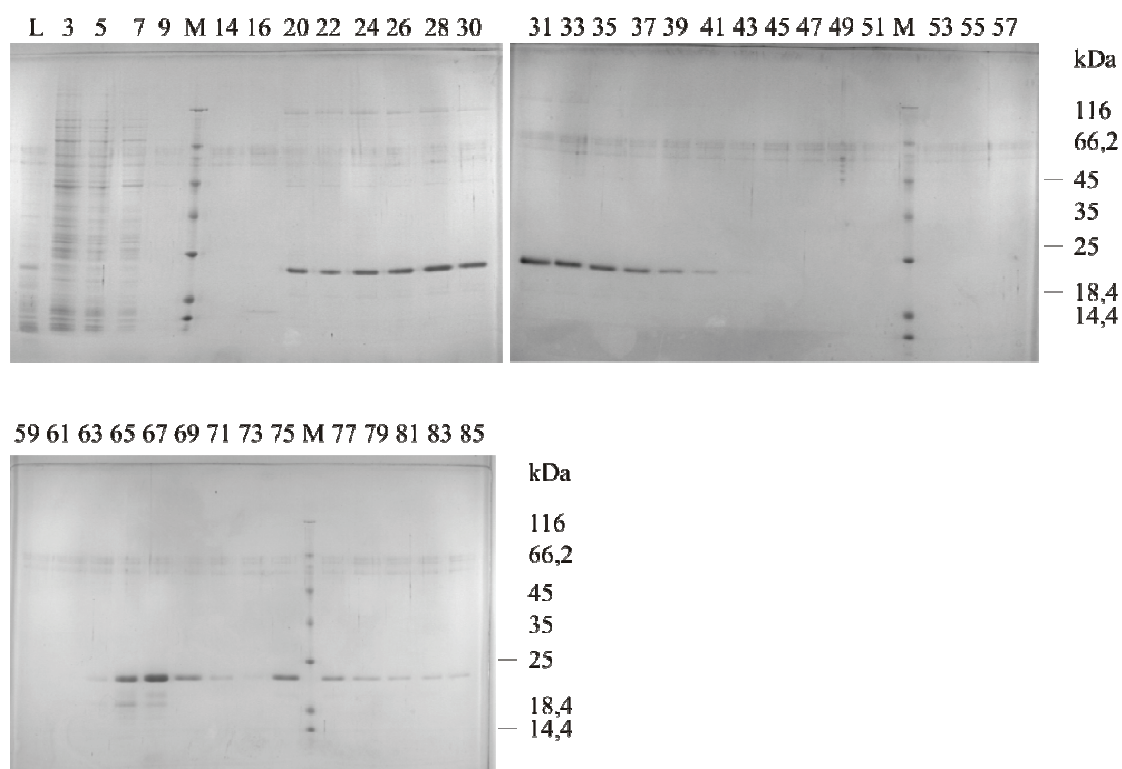


Abb. 39: SDS-PAGE der Fraktionen der Affinitätsreinigung von ATPOP1p

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 13 % PAA-Gel (29:1, AA:BisAA). Aufgetragen wurden je 10 µl der Durchfluss- (1-14, Puffer A), Wasch- (15-68, Puffer B, C und D) und Elutionsfraktionen (69-85, Puffer E) sowie des Bakterienlysats. L: Lysat der exprimierenden *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS; 3-85: Fraktionsnummern, M: Fermentas Proteinmarker.

4.4.2.1 Präparative Reinigung von *AtRpp30p*

Die Expression im präparativen Maßstab wurde in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS mit dem Expressionsvektor pRSET-ATRpp30-0 durchgeführt. Aus 500 ml Kultur wurden ca. 2 g Zellsediment gewonnen. Nach der Lyse der Zellen mit Puffer A wurde der Protein-Rohextrakt jeweils im Batch-Verfahren an 5 ml Ni^{2+} -Agarose-Matrix gebunden und mit je 12 ml Puffer B, C und D gewaschen (Abb. 40). Dabei eluiert der unspezifisch an die Säule gebundene Anteil des rekombinanten Proteins. Die Elution wurde mit imidazolhaltigem Puffer E solange durchgeführt, bis im Eluat kein Protein mehr detektiert werden konnte. Um die Reinheit und Ausbeute des Proteins zu verbessern, wurden verschiedene Parameter verändert. Eine Vergrößerung des Durchmessers der Säule von 0,7 auf 1,5 cm bei gleichem Volumen, führte zu einer besseren Anreicherung. Die Erhöhung des Säulenvolumens von anfangs 1 ml auf 5 ml ermöglichte es, die schwache Bindung an die Säule zu kompensieren und so zusätzlich die Ausbeute zu erhöhen. Die Verwendung von Stufengradienten verbesserte die Wasch- und Elutionsschritte. Das hier gereinigte Protein *AtRpp30-0p* besitzt eine theoretische Molekülmasse von 73,7 kDa und zeigt im Polyacrylamidgel das Laufverhalten eines ca.

110 kDa großen Proteins (Abb. 41). Nach Vereinigung der proteinhaltigen Fraktionen wurden durchschnittlich 5 mg AtRpp30p aus 1 L Kultur isoliert. Zur Lagerung bei -20 °C wurden die Protein-Präparationen gegen Puffer F-GP dialysiert (3.7.6). Unter diesen Bedingungen waren die Präparationen mehrere Monate stabil; bei 4 °C war die Präparation nur für ca. 1-2 Monate haltbar.

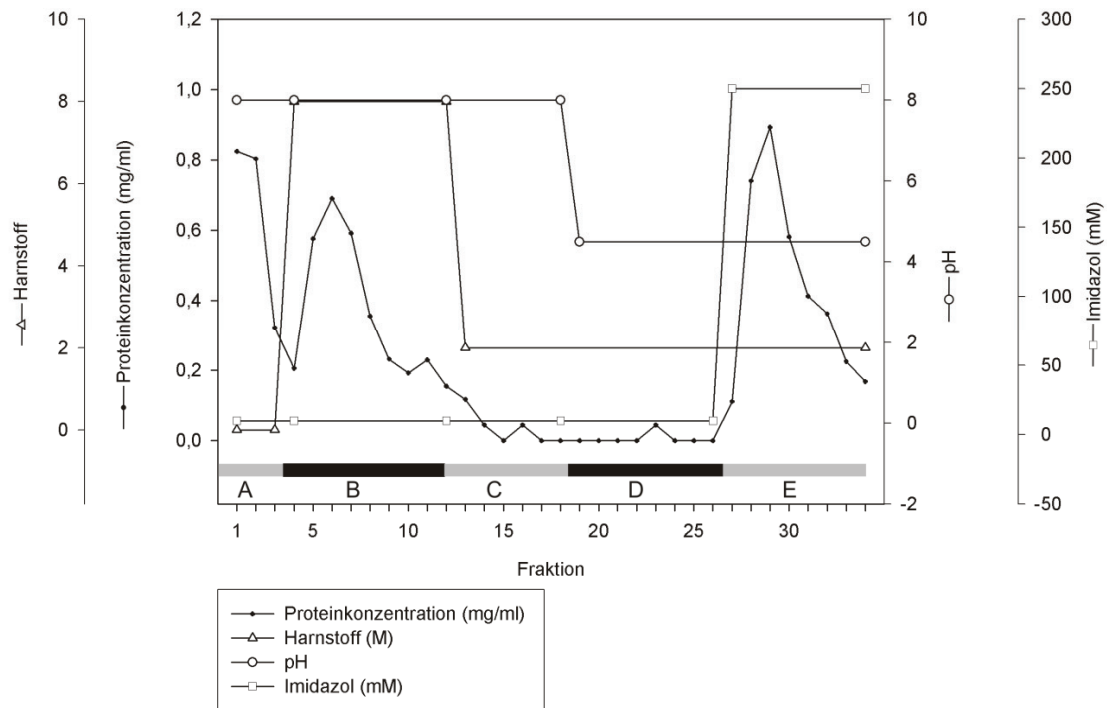


Abb. 40: Elutionsprofil der Affinitätschromatografie von AtRpp30-0p

Das geklärte Lysat von 1 L Kultur wurde an 5 ml Ni-NTA-Agarose gebunden. Ein beträchtlicher Teil des Proteins löst sich bereits während der ersten Waschschritte mit Puffer B, das gereinigte Protein wird durch 250 mM Imidazol eluiert.

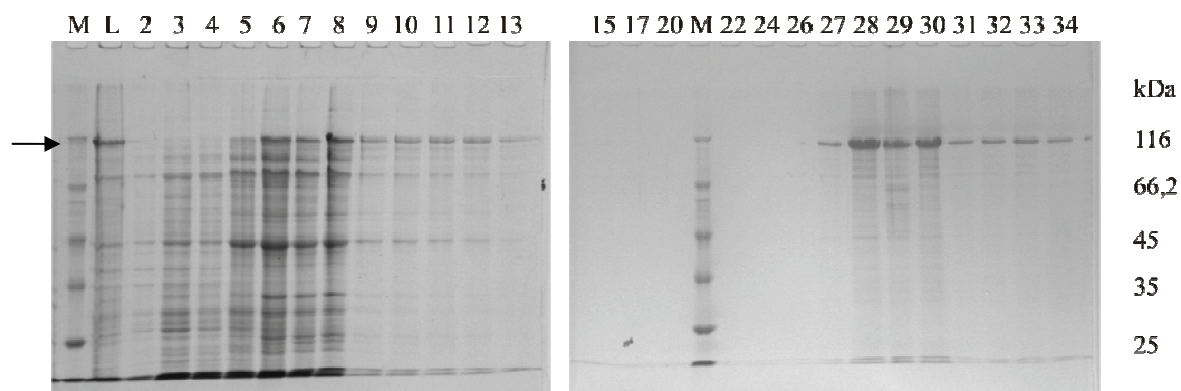


Abb. 41: SDS-PAGE der Fraktionen der Affinitätsreinigung von AtRpp30-0p

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 11 % PAA-Gel (37,5:1, AA:BisAA). Aufgetragen wurden je 7,5 µl der Durchfluss- (2, 3, Puffer A), Wasch- (4-26, Puffer B, C, D) und Elutionsfraktionen (27-34, Puffer E) sowie des Bakterienlysats (L). Der Pfeil markiert das rekombinante AtRpp30-0p. Fraktionsvolumen 1,5 ml, M: Fermentas Proteinmarker.

4.4.2.2 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen AtRpp30p

Zur Immunisierung von zwei Kaninchen (Eurogentec, Kaninchen 1: #0001, Kaninchen 2: #0002) wurden je 4 x 400 mg AtRpp30-0p eingesetzt. Das Protein wurde wie in 4.4.2.1 beschrieben gereinigt, gegen Puffer F-GP dialysiert und anschließend lyophilisiert. Für die Immunisierung wurde das rekombinante AtRpp30-0p mit His₆-Tag verwendet, da es nicht gelang das N-terminale Fusionspeptid mit dem His₆-Tag abzuspalten. Vor der ersten Immunisierung wurde den Kaninchen eine Probe Präimmunserum abgenommen und das Protein in vier Injektionen appliziert. Während der Immunisierung wurden zwei Serumproben abgenommen. Die letzte Blutabnahme erfolgte 116 Tage nach der ersten Immunisierung. Anhand eines Dot-Blots wurde die optimale Verdünnung der Antikörper bestimmt (Abb. 42).

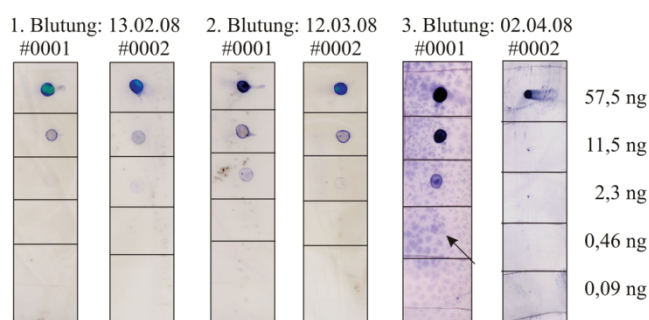


Abb. 42: Dot-Blot von AtRpp30p

Die Detektion erfolgte mit den AtRpp30-0p-spezifischen Kaninchenserum #0001 und #0002 aus je drei Blutungen (1:2000) und einem Kaninchen-IgG-spezifischen Sekundärantikörper (an Alkalische Phosphatase gekoppelt, 1:10000). Der Antikörper wurde mit dem Substrat NBT/BCIP nachgewiesen. Mit dem Serum #0001 konnten bis zu 0,46 ng (5,6 fmol) des rekombinanten Proteins detektiert werden (Pfeil).

Für das spezifische Serum (#0001) wurde im Dot-Blot die maximale Verdünnung von 1:2000 ermittelt. Dabei konnte das Antigen AtRpp30-0p in einer Menge von 28 fmol (2,29 ng) gut detektiert werden. Mit diesem Serum ist auch eine schwache Detektion von 5,6 fmol AtRpp30-0p (0,46 ng) möglich (Abb. 42, Pfeil). Die Präimmunseren beider Kaninchen zeigten keine Reaktion gegen das homologe Antigen AtRpp30-0p.

4.4.2.3 Präparative Reinigung von AtRpp38p

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das rekombinante Protein AtRpp38p heterolog überexprimiert und durch Affinitätschromatografie an einer Nickel-Sepharose gereinigt. Dazu wurde der Expressionsvektor pRSET-AtRpp38p (Dahl, 2003) in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS zur Expression gebracht (3.6.2). Für die Reinigung wurden die Waschschritte mit niedrigerer Imidazolkonzentration (10 mM) durchgeführt, da sich das Protein schon bei 15 mM Imidazol von der Affinitätssäule löst. Außerdem wurden Stufengradienten für die Wasch- und Elutionspuffer verwendet, da dies die Ausbeute erhöht. Aus 1 L Kultur konnten so ca. 9 mg

des reinen Proteins erhalten werden. Für Interaktionsstudien wurde gereinigtes AtRpp38p aus der Elutionsfraktion E10 (Abb. 43, Abb. 44) verwendet.

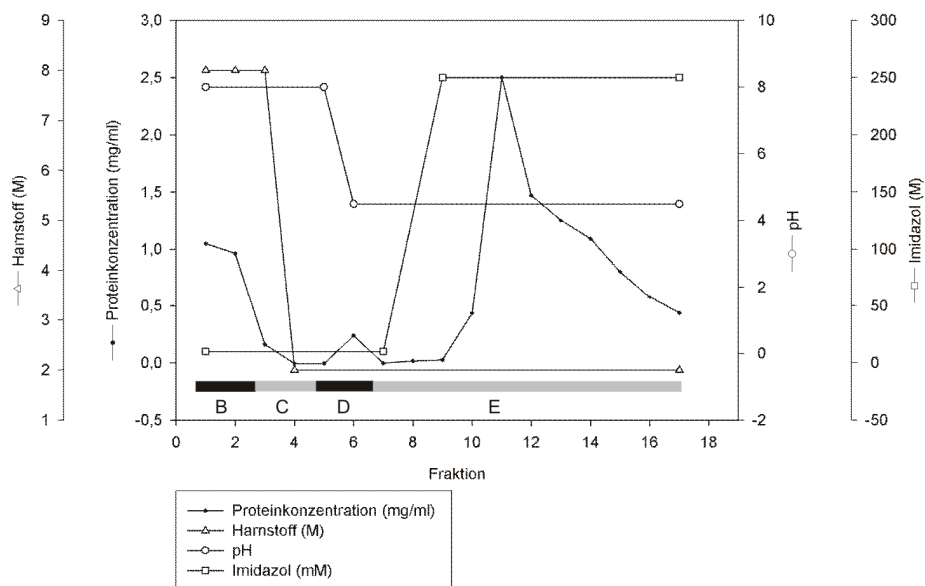


Abb. 43: Elutionsprofil der Affinitätschromatografie von rekombinantem AtRpp38p

Das Lysat aus 1 L Kultur wurde mit 2 ml Ni-NTA-Agarose über Nacht inkubiert. Die Abtrennung der unspezifisch gebundenen Proteine erfolgte mit den Waschpuffern B, C, D. Die Elution des AtRpp38p erfolgte mit Puffer E. Folgende Fraktionen wurden gesammelt und die Proteinkonzentration durch Bradford-Assay bestimmt: 1: Durchfluss; 2-7: Waschfraktionen; 8-17 Elutionsfraktionen. Durchfluss 10 ml; Waschfraktionen je 5 ml, Elutionsfraktionen je 1 ml.

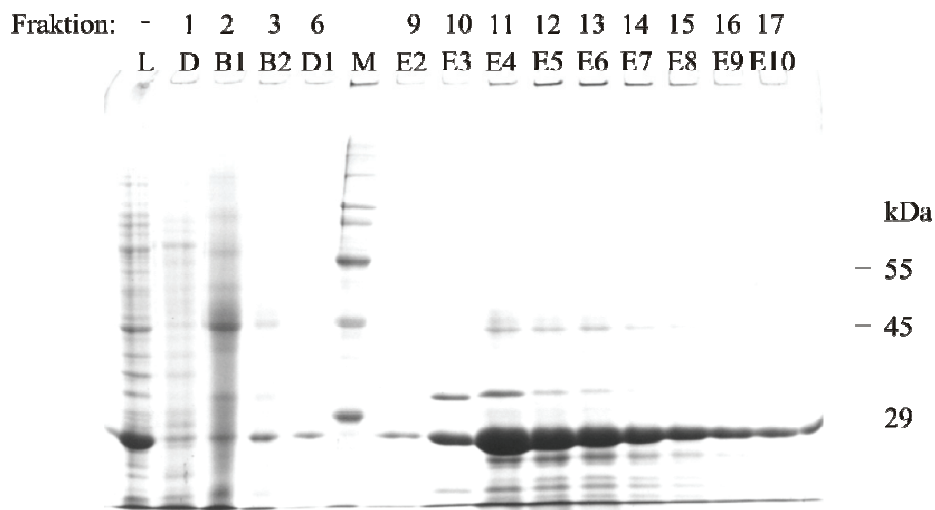


Abb. 44: SDS-PAGE der Fraktionen der Affinitätsreinigung von AtRpp38p

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 12 % PAA-Gel (29:1, AA:BisAA). Aufgetragen wurden je 10 µl der Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen; L: Lysat der exprimierenden *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS; D: Durchfluss; B1, B2, D: Waschfraktionen mit den Puffern B bzw. D; E2-E10: Elutionsfraktionen, M: Serva High Molecular Weight Marker.

Das rekombinant exprimierte Protein AtRpp38p hat ein theoretisches Molekulargewicht von 23 kDa (18,9 kDa ohne His₆-Tag). In PAA-Gelen zeigt es das Laufverhalten eines 26 kDa

Proteins (Abb. 44). Gegen das reine Protein mit His₆-Tag waren Kaninchen-Antikörper hergestellt worden (C. Heubeck, unveröffentlicht), um diese für immunologische Nachweisverfahren einzusetzen.

4.5 Gelelektrophoretische Analyse von Protein-RNA-Komplexen

4.5.1 Renaturierung von strukturierten RNAs

Um die *Ath* RNase MRP RNAs in Bindungsversuchen einsetzen zu können, mussten diese einer Denaturierung mit anschließender Renaturierung unterzogen werden, um ihre natürliche Konformation auszubilden. Die Renaturierungsbedingungen wurden für die RNAs optimiert (Abb. 45). Die Auftrennung der radioaktiv markierten Konformationsisomere erfolgte auf nativen Polyacrylamidgelen und die Detektion im Phosphoimager.

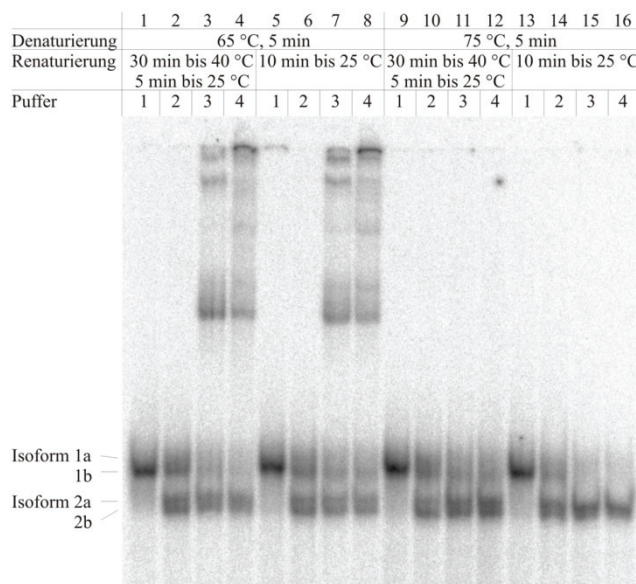


Abb. 45: Analyse des Laufverhaltens der MRPR1 im nativen PAA-Gel

Der Renaturierungspuffer besteht aus TE (1) bzw. TE mit folgenden Zusätzen: 2) 50 mM NaCl; 3) 50 mM NaCl + 2 mM MgCl₂; 4) 2 mM MgCl₂. Die Denaturierungs- und Renaturierungsprozedur der RNAs ist über dem Bild angegeben. Für das 6 % PAA-Gel (29:1, AA:BisAA) wurde 0,5 x TBE-Puffer verwendet.

Alle Proben wurden zuerst im angegebenen Puffer für 5 min bei 65 °C bzw. 75 °C denaturiert und anschließend zur Renaturierung in einem langsamen (zuerst 30 min bis 40 °C, dann 5 min bis 25 °C) oder schnellen Modus (10 min bis 25 °C) abgekühlt, mit Probenpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Denaturierung bei 65 °C lieferte in den ersten Versuchen keine einheitliche Konformation. Es waren immer mindestens zwei Strukturisomere sichtbar. Die Supplementierung des Puffers mit verschiedenen Salzen führte bei Denaturierung mit 65 °C zu einer Bildung von großen RNA-Aggregaten, die sich nicht eindeutig auflösen lassen

(Spur 3, 4 und 7, 8 in Abb. 45). Durch NaCl wurde eine Gleichverteilung der beiden Isoformen 1 und 2 beobachtet (Spur 2, 6, 10, 14 in Abb. 45). Die Zugabe von MgCl_2 zur RNA begünstigte allein die kompaktere Isoform 2. Sie lässt sich wie auch die Isoform 1 in zwei Spezies unterteilen (mit a und b gekennzeichnet). Die kompaktere Isoform 2b wird vollständig ausgebildet, wenn die Denaturierung bei 75 °C durchgeführt wurde. In den folgenden Bindungsversuchen wurde die Denaturierung bei 75 °C, 5 min, in TE-Puffer mit 2 mM MgCl_2 durchgeführt. Die Renaturierung erfolgte im schnellen Modus durch Abkühlung bei RT für 10 min, bevor die RNA zum Bindungsansatz gegeben wurde. Weitere Versuche zeigten, dass eine Lagerung der RNA im Eisbad zwischen Renaturierungsschritt und Bindung die Isoform 1 begünstigt, so dass dies vermieden wurde. Aufgrund der Ähnlichkeiten der Sequenz und vermuteten Struktur der MRPR2 zur MRPR1 wurde die Renaturierung in gleicher Weise für diese RNA durchgeführt.

Die beschriebene Vorbehandlung führte bei der verkürzten RNA Variante, die nur der S-Domäne der MRPR1 entspricht, zur Bildung von Dimeren und Multimeren. Die Renaturierung musste hierfür modifiziert werden. Eine schnelle Abkühlung im Eisbad verhinderte dabei die Multimerbildung (Abb. 46, Spur 6).

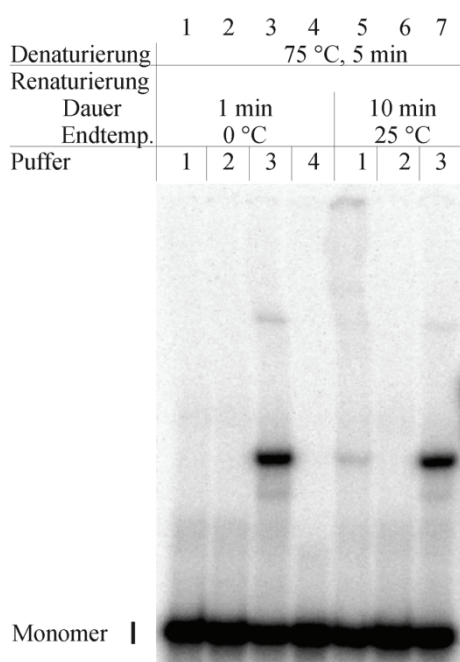


Abb. 46: Analyse des Laufverhaltens der MRPR1/S-Domäne im nativen PAA-Gel

Alle Proben wurden zuerst für 5 min bei 75 °C denaturiert und anschließend zur Renaturierung in einem langsameren (10 min bis 25 °C) oder schnellen (auf Eis) Modus abgekühlt. Der Puffer besteht aus TE mit folgenden Zusätzen: 1) 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 ; 2) 50 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 ; 3) 2 mM MgCl_2 ; 4) kein Zusatz.

4.5.2 Optimierung der Komplexbildungs-Bedingungen

Für die Bindungsversuche wurden RNase P/MRP Proteine eingesetzt, die über IMAC (3.6.3.5) gereinigt und nach Dialyse in Puffer F-GP (3.7.6) bei -20 °C gelagert wurden. Die gereinigten MRPR-Transkripte wurden in TE-Puffer gelöst und für die Komplexbildung wie

unter 4.5.1 vorbehandelt. Radioaktiv markierte RNAs wurden gegebenenfalls durch Zugabe von unmarkierten Transkripten auf die erforderliche Konzentration eingestellt.

Für die Analyse der Protein-RNA-Komplexbildung wurden native PAA-Gelsysteme mit 5,6 % PAA (29:1, AA:BisAA) und verschiedenen Puffersystemen verwendet (3.7.2) und die getrockneten Gele im Phosphoimager analysiert. Zu einer Verbesserung der Komplexbildung führten EDTA-freie Pufferbedingungen, da Mg^{2+} für die Strukturstabilisierung der RNA und die Bindung an die Proteine essentiell ist. Auf die Zugabe von Glycerin wurde verzichtet, da es die Komplexbildung verhinderte (Abb. 56) und teilweise ein schlechtes Einlaufen der Proben in das Gel verursachte. Obwohl die Proteine in PBS-Puffer gut löslich sind, ist die native Konformation offenbar nicht vorherrschend. Eine Komplexbildung mit Proteinen in diesem Puffer konnte nicht beobachtet werden. Erst die Dialyse gegen Puffer F-GP führt zu einer detektierbaren Interaktion. Obwohl der größte Teil der Proteine in nativen Puffern unlöslich ist, befinden sich in der Regel ca. 10 % des Proteins in einem löslichen Zustand. Die Abtrennung der unlöslichen Proteine erfolgte durch Zentrifugation (5 min, 10000 x g). Eine Erhöhung der Bindungstemperatur von 22 °C auf 26 °C und Rotation bei 350 Upm für bis zu 30 min verbesserten die Komplexbildung.

4.5.3 Komplexbildung von *AtPOP1p* mit *MRPR1*

In Vorversuchen wurden die optimalen Bindungsbedingungen für die Bindung von *AtPOP1p* an *MRPR1* ermittelt. Dabei zeigte sich der Zusatz von 0,1 % Triton X-100 als bindungsfördernd, eine Erhöhung auf bis zu 1 % bewirkte keine weitere Verbesserung der Bindung. In Reaktionsansätzen ohne Triton X-100 konnte keine Bindung beobachtet werden. Die Reduktion der NaCl-Konzentration bewirkte eine bessere Bindung des Proteins an die RNA (Abb. 47, Spur 9-13). Die Zugabe von 100 mM NH_4Cl oder NH_4Ac ermöglichte eine gute Bildung der Komplexe (Abb. 47, Spur 3 und 4). Wie in Abb. 45 konnte bei der Komplexbildung mit *AtPOP1p* (Abb. 47) ein Gleichgewicht der beiden Isoformen der *MRPR1* identifiziert werden, das von der Salzkonzentration abhängt. Die Bindung von *AtPOP1p* an die RNA wird also indirekt durch die Salzkonzentration bzw. Ionenart beeinflusst. Für alle weiteren Bindungsversuche mit *AtPOP1p* wurde folgender Puffer verwendet: 20 mM Tris-HCl, pH 8; 5 mM $MgCl_2$; 50 mM NaCl; 0,1 % Triton X-100; 1 mM DTT; 0,4 U/ μ l RNase Inhibitor. Zur Komplexbildung erfolgte die Inkubation für 30 min bei 350 Upm und 25 °C.

Bei Verwendung von 0,5 x Tris-Borat (TB) gepufferten Gelen verbleiben die Komplexe zum größten Teil in der Tasche, daher wurde 0,5 x Tris-Glycin (TG) als Puffersystem verwendet, um ein besseres Einwandern der gebildeten Komplexe zu erreichen (Abb. 55). Die

Verringerung des Vernetzungsgrades durch Änderung des AA:BisAA-Verhältnisses von 19:1 zu 29:1 verbesserte das Laufverhalten und ermöglichte die Analyse des Bindungsverhaltens.

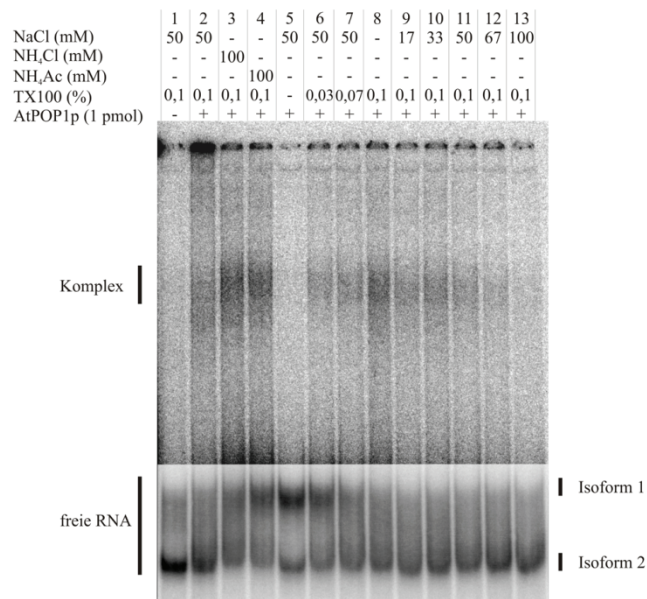


Abb. 47: Komplexbildung aus AtPOP1p und MRPR1 unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

Komplexe wurden auf einem 5,6 % PAA-Gel (29:1, AA:BisAA), 0,5 x TG analysiert. Je Ansatz wurden 1 pmol AtPOP1p und 25,2 fmol RNA in verschiedenen Bindungspuffern inkubiert. Wegen der geringen Signalstärke der Komplexe im Vergleich zu der ungebundenen RNA wurden diese mit stärkerer Kontrastierung dargestellt.

Um die Spezifität der Bindung an die RNA zu untersuchen, wurden kompetitive Bindungsansätze mit Poly(I•C), nichtradioaktiver MRPR1 bzw. *A. thaliana*-mRNA untersucht. Die Bindung von AtPOP1p an MRPR1 kann durch die zum Protein äquimolare Menge an unmarkierter RNA unterbunden werden (Abb. 48). Auch große Mengen an einzelsträngiger mRNA (100 ng) sind in der Lage, die Bindung zwischen Protein und RNA zu inhibieren. Die Zugabe von Poly(I•C) als dsRNA hemmt die Protein-RNA-Interaktion nicht.

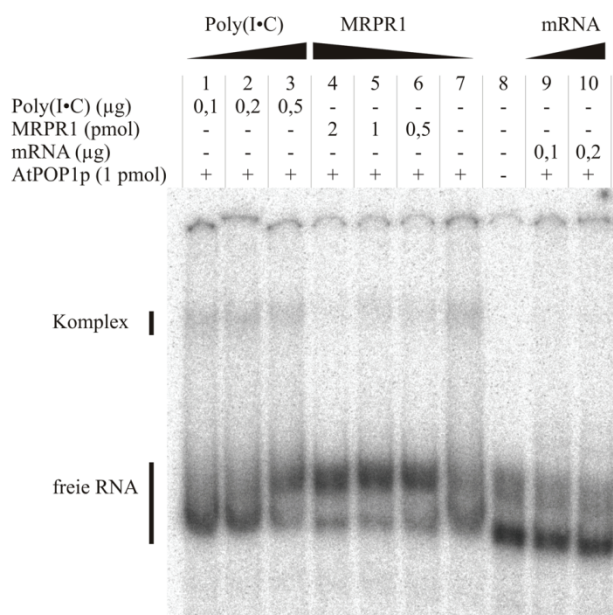


Abb. 48: Spezifität der Bindung von AtPOP1p an MRPR1

Eingesetzt wurden 1 pmol AtPOP1p und 50 fmol radioaktiv markierte MRPR1 nach Renaturierung; 5,6 % PAA-Gel (29:1, AA:BisAA), 0,5 x TG; mRNA: mRNA aus *A. thaliana*; Bindungspuffer: 50 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM Tris-Cl pH 8; 1 mM DTT; 0,1 % Triton X-100; 0,4 U/μl RNasin

4.5.3.1 Bestimmung der Bindungskonstanten von AtPOP1p zu MRPR1

Die durchgeführten Komplexbildungsversuche wurden densitometrisch analysiert, die Messwerte in die entsprechenden Konzentrationen der RNA umgerechnet und die relevanten Größen ermittelt (3.4.2.6; siehe Anhang Tab. 7 und Tab. 8). Die Auswertung der POP1p-MRPR-Bindungsdaten ist wegen der geringen beobachteten Bindung schwierig. Die geringe Komplexbildung führt bei einer densitometrischen Analyse durch die schwachen Banden besonders bei der niedrigeren Proteinkonzentration von $c(\text{AtPOP1p}) = 0,125 \mu\text{M}$ (Abb. 49) zu einer stärkeren Schwankung der Werte. Durch die Verwendung von silanisierten Reaktionsgefäßen wurde gewährleistet, dass die Komplexe nicht an die Gefäßwand binden und der gesamte Reaktionsansatz auf das Gel übertragen wurde.

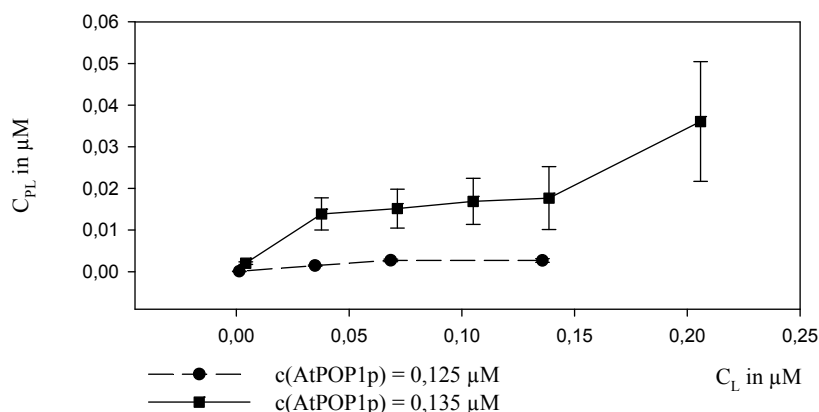


Abb. 49: Direkte Auftragung der Bindung von MRPR1 an AtPOP1p

Die Bindungsversuche wurden mit zwei Proteinpräparationen unterschiedlicher Konzentrationen durchgeführt. Die dargestellten Werte entsprechen gewichteten Mittelwerten aus 4 bzw. 5 Einzelwerten. Die Standardabweichungen wurden für alle Werte eingetragen. $C_{PL} = c(\text{MRPR1} \cdot \text{AtPOP1p})$; $C_L = c(\text{MRPR1})$;

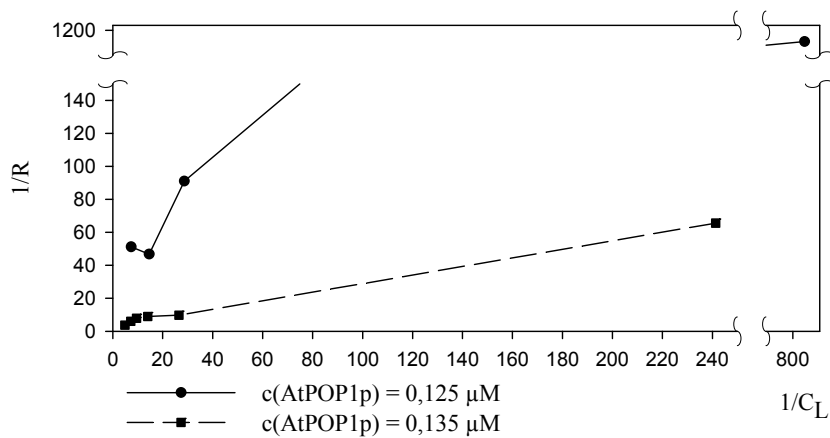


Abb. 50: Doppelt-reziproke Auftragung der Bindung von MRPR1 an AtPOP1p

Die Standardabweichungen sind zu vernachlässigen. Aus den Regressionsgeraden leiten sich die Bindungskonstanten n und k_s ab. $1/R = c(\text{AtPOP1p})/c(\text{MRPR1} \cdot \text{AtPOP1p})$; $1/C_L = 1/c(\text{MRPR1})$

$c(\text{AtPOP1p})$	Geradengleichung	n	k_s
0,125 μM	$y = 1,29x + 41,1$	0,024	0,031 μM
0,135 μM	$y = 0,25x + 4,1$	0,244	0,062 μM

Unter der Annahme, dass ein Protein an ein RNA-Molekül bindet, folgt aus den Bindungskonstanten in Abb. 50, dass in der Proteinprobe mit $c = 0,125 \mu\text{M}$ weniger als 10 % der Proteine ($n < 0,1$), in der anderen Probe ca. 25 % der Proteine ($n \sim 0,25$) in einer bindungsaktiven Faltung vorliegen. Die Gleichgewichtskonstante liegt mit 0,03-0,06 μM im Bereich für eine spezifische Bindung.

Die Analyse der Bindung von AtPOP1p und MRPR1 durch die Regression nach Scatchard (Abb. 51) und Hanes (Abb. 52) bestätigen die in der Klotz-Linearisierung (Abb. 50) ermittelten Werte für die Bindungszahl n und die Gleichgewichtskonstante k_s . Obwohl die quantitative Charakterisierung der Bindung von AtPOP1p an MRPR1 durch die geringe Ausbildung der Komplexe Schwankungen unterlag, konnte die Spezifität der Bindung qualitativ eindeutig gezeigt werden. In Abhängigkeit von der Proteinpräparation konnte für die Bindung von AtPOP1p an MRPR1 eine Assoziationskonstante (k_s) von 0,03-0,13 μM ermittelt werden.

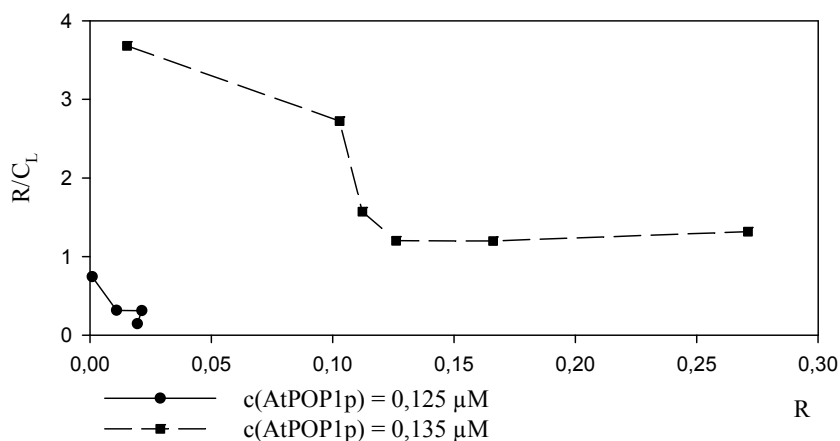


Abb. 51: Lineare Darstellung der Bindungswerte der POP1p-MRPR1-Komplexe nach Scatchard

Aus den Geraden werden die folgenden Bindungswerte ermittelt.

$$R = c(\text{MRPR1} \cdot \text{AtPOP1p}) / c(\text{AtPOP1p}); R/C_L = c(\text{MRPR1} \cdot \text{AtPOP1p}) / c(\text{AtPOP1p}) * c(\text{MRPR1})$$

c(AtPOP1p)	Geradengleichung	n	k _s
0,125 μM	y = - 24,27x + 0,69	0,03	0,04 μM
0,135 μM	y = - 9,22x + 3,17	0,34	0,11 μM

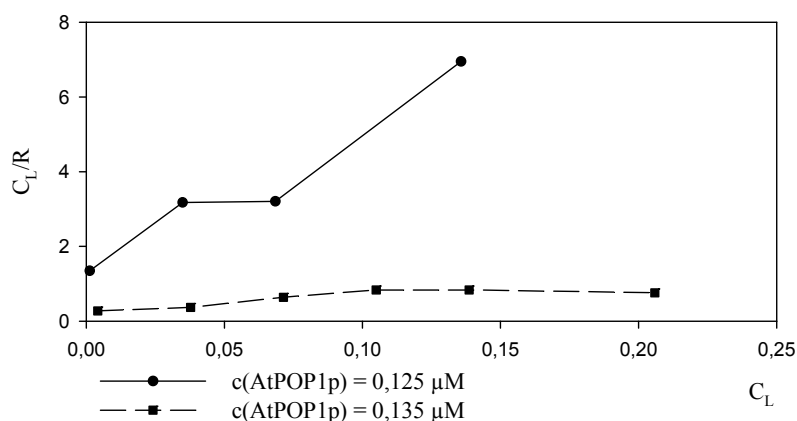


Abb. 52: Lineare Darstellung der Bindungswerte nach Hanes

Aus den Geraden leiten sich die Bindungszahl n und k_s ab. $C_L = c(\text{MRPR1})$;

$$C_L/R = c(\text{AtPOP1p}) / c(\text{MRPR1} \cdot \text{AtPOP1p})$$

c(AtPOP1p)	Geradengleichung	n	k _s
0,125 μM	y = 39,79x + 1,28	0,03	0,03 μM
0,135 μM	y = 2,76x + 0,36	0,36	0,13 μM

4.5.3.2 Bindung von AtPOP1p an MRPR-Varianten und pre-tRNA

Neben der Bindung an MRPR1 wurde auch das Bindungsverhalten von AtPOP1p an die Varianten MRPR1-1, MRPR1-3, MRPR1-4 und MRPR2 untersucht (Abb. 53). Es konnte gezeigt werden, dass außer den vollständigen RNAs die C-Domäne (MRP1-1) und etwas

schwächer die S-Domäne (MRPR1-3) zur Komplexbildung mit AtPOP1p fähig sind. Eine Komplexbildung mit der Helix P3 (MRP1-4) ist nicht nachzuweisen.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob AtPOP1p eine Rolle bei der Bindung der MRPR an ein RNase P-Substrat spielen könnte. Dazu wurde das radioaktiv markierte Transkript einer pre-tRNA^{Tyr} aus *Nicotiana tabacum* (Tabak) im Bindungsansatz eingesetzt (Abb. 53 A; Proben 3, 4). Dabei kann eine schwache Bindung von AtPOP1p an pre-tRNA^{Tyr} nachgewiesen werden. In einem weiteren Versuch wurde die Ausbildung eines ternären Komplexes zwischen AtPOP1p, MRPR1 und der pre-tRNA^{Tyr} analysiert (Abb. 54). Auch bei hohen Substratkonzentrationen konnte dabei weder die Bildung eines ternären Komplexes, noch eine Konkurrenz der tRNA mit der MRPR1 als Bindungspartner für das Protein beobachtet werden.

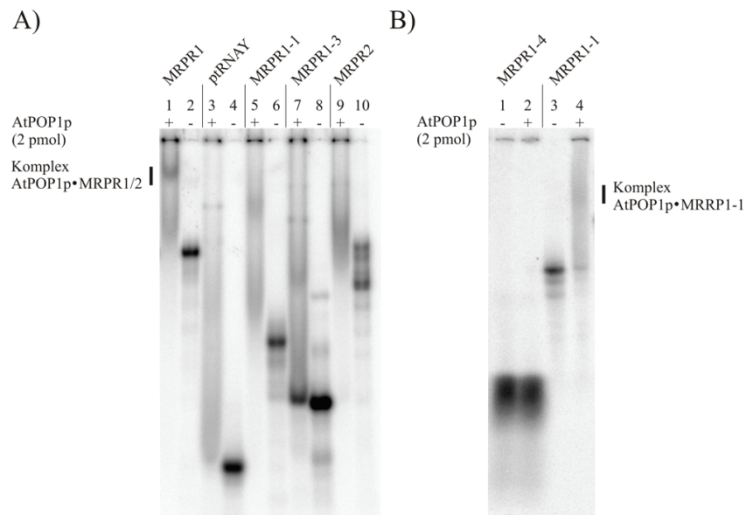


Abb. 53: Bindung von AtPOP1p an MRPR-Varianten und pre-tRNA^{Tyr}

Für die Bindungsreaktion wurden je 10000 cpm der radioaktiven Transkripte mit 2 pmol AtPOP1p unter Standardbedingungen (4.5.3) inkubiert und auf einem 5,6 % PAA-Gel (0,5 x TG-Puffer) analysiert.

A) Probe 1, 2: MRPR1 (34,5 fmol; 264 Nt); 3, 4: pre-tRNA^{Tyr} aus *N. tabacum* (93,6 fmol; 82 Nt); 5, 6: MRPR1-1/C-Domäne (45,5 fmol; 153 Nt); 7, 8: MRPR1-3/S-Domäne (67,4 fmol; 125 Nt); 9, 10, MRPR2 (26,7 fmol; 268 Nt);

B) Probe 1, 2: MRPR1-4/P3 (337 fmol; 31 Nt); 3, 4: MRPR1-1/C-Domäne (45,5 fmol; 153 Nt). Die Position der Komplexe mit MRPR1, MRPR2 in A) und mit MRPR1-1/C-Domäne in B) sind durch Markierungen am Rand verdeutlicht.

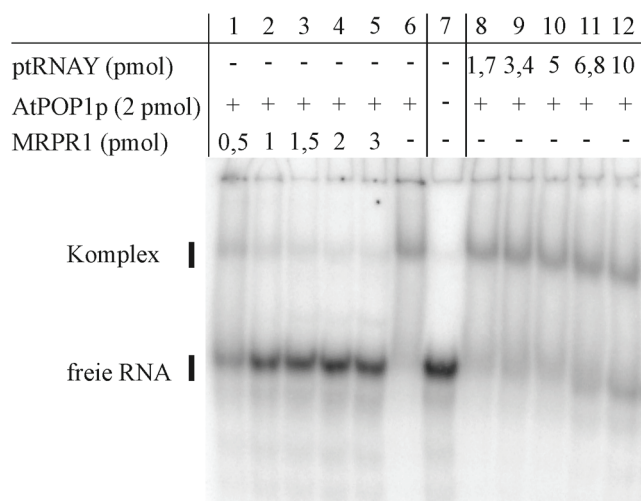


Abb. 54: Einfluss des RNase P-Substrats auf die Komplexbildung von AtPOP1p mit MRPR1

Je 2 pmol AtPOP1p wurden mit radioaktiv markierter MRPR1 (62 fmol) unter Standardbedingungen zur Bindung gebracht und auf einem 5,6 % PAA-Gel (0,5 x TG) aufgetrennt. Zu den verschiedenen Ansätzen wurde vor Zugabe des Proteins unmarkierte MRPR1 (1-5) bzw. pre-tRNA^{Tyr} (ptRNAY, 8-12) zugegeben.

4.5.4 Komplexbildung von AtRpp38p und MRPR1

In Vorversuchen wurden die optimalen Bindungsbedingungen für die Bindung von AtRpp38p an MRPR1 ermittelt. Die Analyse der Komplexe zwischen MRPR1 und AtRpp38p gelang nur in 0,5 x TB gepufferten Gelen, nicht aber in 0,5 x TG gepufferten (Abb. 55). Eine Erhöhung der Ionenstärke auf 0,75 x TB resultierte in der Bildung unlöslicher Komplexe, die keine elektrophoretische Mobilität mehr besitzen und in der Geltasche verbleiben (nicht gezeigt).

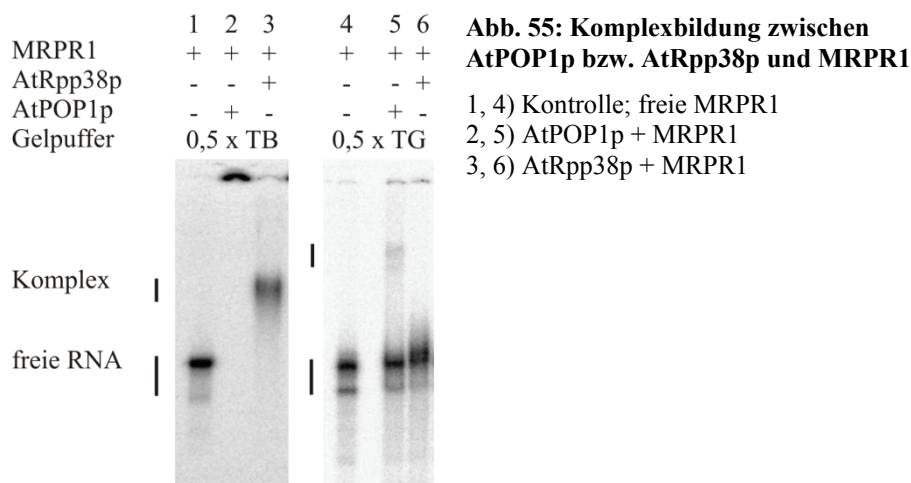


Abb. 55: Komplexbildung zwischen AtPOP1p bzw. AtRpp38p und MRPR1
 1, 4) Kontrolle; freie MRPR1
 2, 5) AtPOP1p + MRPR1
 3, 6) AtRpp38p + MRPR1

Der Zusatz von 0,1 % Triton X-100 erwies sich als bindungsfördernd, eine Erhöhung auf 0,5 % verbesserte die Bindung aber nicht (Abb. 56 A). Die Zugabe von Glycerin bewirkte eine Hemmung der Bindung. Die Konzentration von Chloridionen wurde auf 50 mM eingestellt. Dabei spielt es keine Rolle, ob Natrium- oder Kalium-Ionen das Gegenion bilden (Abb. 56 B).

Für alle weiteren Bindungsversuche mit AtRpp38p wurde folgender Puffer verwendet: 20 mM Tris-HCl, pH 8; 5 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 0,1 % Triton X-100; 1 mM DTT;

0,4 U/ μ l RNase Inhibitor. Die Verwendung von Gelen mit dem AA:BisAA-Verhältnis 29:1 kann zwar die scharfen Komplexbanden nicht so gut auflösen wie Gele mit 19:1 AA:BisAA, doch werden die Komplexe eindeutiger von der freien RNA getrennt.

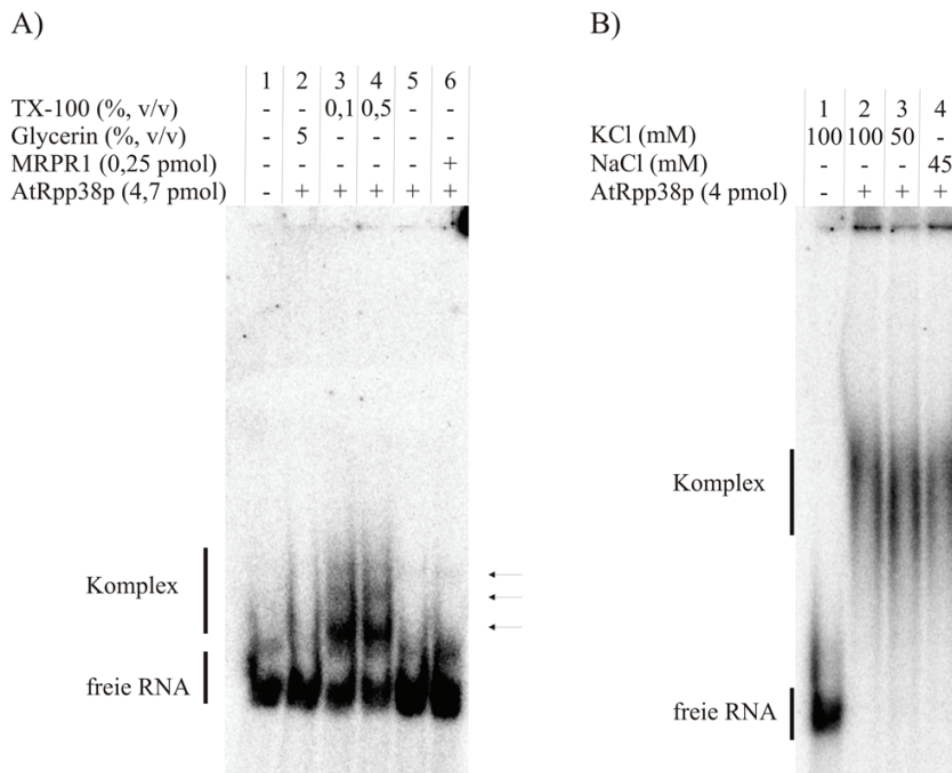


Abb. 56: Abhängigkeit der Bindung zwischen AtRpp38p und MRPR1 von Triton X-100, Glycerin und Salzbedingungen

Das gereinigte Protein wurde mit je 19 fmol radioaktiver MRPR1 gemischt und 20 min bei 25 °C, 350 Upm (Eppendorf Thermomixer) inkubiert.

A) Natives 6 % PAA-Gel (19:1, AA:BisAA), 0,5 x TB. Probe 1: Kontrolle, RNA ohne Protein, Proben 2-4: Einfluss von Glycerin bzw. Triton X-100; Probe 5: RNA mit Protein ohne Zusatz, Probe 6: Konkurrenz mit unmarkierter MRPR1. Pfeile zeigen die Position der Komplexe.

B) Natives 6 % PAA-Gel (29:1, AA:BisAA), 0,5 x TB. Die Bindungsreaktionen enthalten unterschiedliche KCl- bzw. NaCl-Konzentrationen. Probe 1: RNA-Kontrolle; Proben 2-4: RNA mit Protein unter verschiedenen Salzbedingungen.

4.5.4.1 Spezifität der Komplexbildung zwischen AtRpp38p und MRPR1

Die Spezifität der Bindung wurde durch Konkurrenz mit Poly(I•C), nichtradioaktiver MRPR1 bzw. *A. thaliana*-mRNA untersucht. Abb. 57 zeigt, dass die Bindung von AtRpp38p an MRPR1 durch die zum Protein äquimolare Menge an unmarkierter RNA unterbunden werden kann. Auch große Mengen an mRNA (100 ng) sind in der Lage, die Bindung zwischen Protein und RNA zu verringern, aber nicht komplett zu inhibieren. Das erlaubt die Schlussfolgerung, dass AtRpp38p in der Lage ist, einzelsträngige RNA (hier: mRNA), aber nicht doppelsträngige RNA (hier: Poly(I•C)) unspezifisch zu binden.

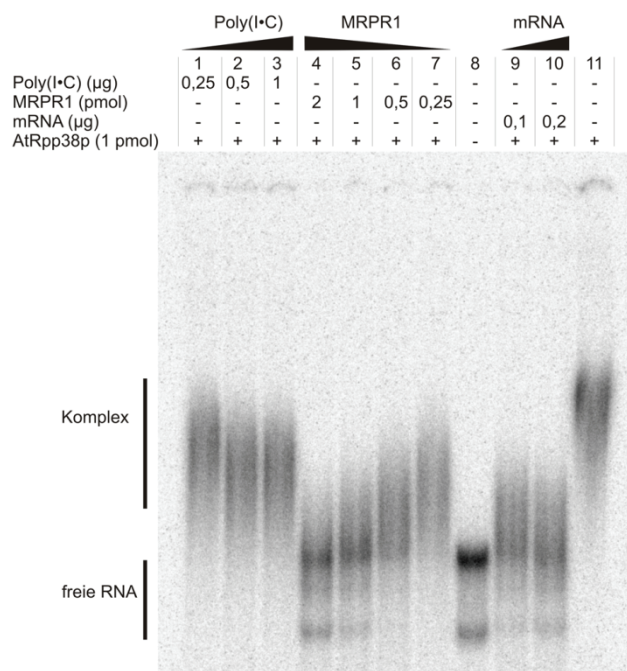


Abb. 57: Bindung von AtRpp38p und MRPR1

Eingesetzt wurden 1 pmol AtRpp38p und 12,6 fmol radioaktiv markierte MRPR1 nach Renaturierung; Die Bindung erfolgt im unter 4.5.4 angegebenen Bindungspuffer. Die Bindungsreaktion wurde für 20 min bei 22 °C und 300 Upm durchgeführt. 5,6 % PAA-Gel (29:1, AA:BisAA), 0,5 x TB; Probe 1-3: Competition mit Poly(I•C), Probe 4-7: Competition mit unmarkierter MRPR1, Probe 8: RNA-Kontrolle, Probe 9, 10: Competition mit mRNA, Probe 11: kein Kompetitor.

4.5.4.2 Bestimmung der Bindungskonstanten von AtRpp38p zu MRPR1

Die erhaltenen EMSA-Analysen wurden densitometrisch analysiert, um eine Abschätzung der Bindungskonstanten durchzuführen. Die densitometrischen Werte wurden in die entsprechenden RNA-Konzentrationen umgerechnet und die relevanten Größen (3.4.3.3) ermittelt (siehe Anhang Tab. 9 - Tab. 12). Die direkte Darstellung des gebundenen Liganden in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration (Abb. 58) zeigt einen flachen Anstieg der Geraden. Dies deutet auf eine geringe Affinität des Proteins gegenüber der RNA als Bindungspartner hin. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration führt zu einer größeren Steigung der Geraden, also einer besseren Bindung. Die Versuche wurden mit drei verschiedenen Proteinpräparationen durchgeführt.

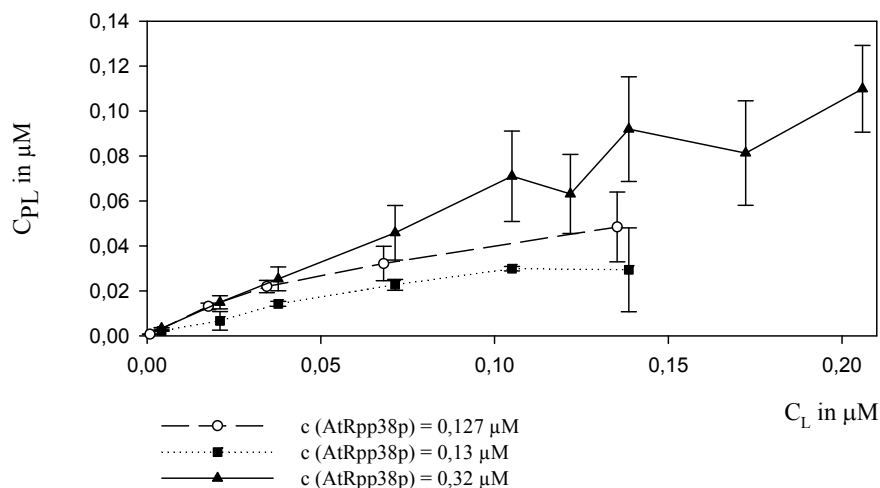


Abb. 58: Direkte Auftragung der Komplexbildung aus MRPR1 und AtRpp38p

Die Bestimmung der Komplexbildung wurde für 3 Proteinkonzentrationen in 2 bzw. 3 Experimenten durchgeführt. Die dargestellten Werte entsprechen dem gewichteten Mittelwert aus je 4-20 Einzelwerten für jeden Messpunkt. $c(\text{Komplex}) = c(\text{MRPR1} \cdot \text{AtRpp38p})$; $C_L = c(\text{MRPR1})$

Abb. 59 zeigt eine Kurvenschar der Bindungsmesswerte nach der Klotz-Linearisierung. Aus der Regressionsgeraden wird für die Bindungszahl $n = 0,5$ ermittelt. Die ermittelte Gleichgewichtskonstante zeigt große Schwankungen ($k_s = 0,34 - 0,83 \mu\text{M}$) zwischen den drei Proteinkonzentrationen.

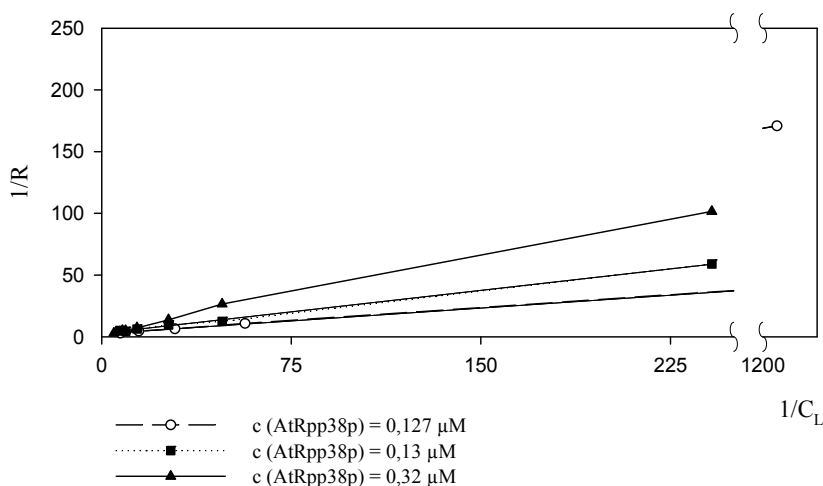


Abb. 59: Doppelt-reziproke Auftragung der Bindung von MRPR1 an AtRpp38p nach Klotz

Die Standardabweichungen sind zu vernachlässigen. Aus den Regressionsgeraden der drei Kurven ergeben sich die Bindungskonstanten n und k_s . $1/R = c(\text{AtRpp38p})/c(\text{MRPR1} \cdot \text{AtRpp38p})$; $1/C_L = 1/c(\text{MRPR1})$

$c(\text{AtRpp38p})$	Geradengleichung	n	k_s
0,127 μM	$y = 0,14x + 2,4$	0,41	0,34 μM
0,13 μM	$y = 0,23x + 2,7$	0,37	0,63 μM
0,32 μM	$y = 0,42x + 2$	0,50	0,83 μM

Die Regression nach Scatchard (Abb. 60) ergibt zwei Gleichgewichtskonstanten ($k_s = 0,1 \mu\text{M}$ bzw. $0,6 \mu\text{M}$) für die Messungen mit verschiedenen Proteinkonzentrationen. Die Bestimmung der Bindungszahl führt zu zwei Ergebnissen. Die Bindungszahl $n = 0,5$ bestätigt das Ergebnis aus der Regression nach Klotz (Abb. 59). Dies könnte darauf hindeuten, dass entweder zwei Proteine oder jedes zweite Protein an eine RNA bindet. Die Kurve mit der größten Proteinkonzentration ergibt eine Bindungszahl $n = 1$.

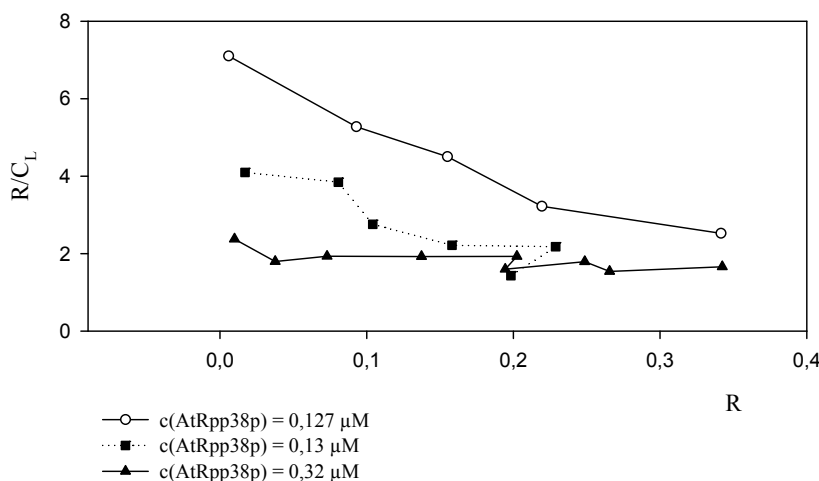


Abb. 60: Lineare Darstellung der Bindung von MRPR1 an AtRpp38p nach Scatchard

Aus den Geraden leiten sich folgende Bindungskonstanten ab. $R = c(\text{MRPR1} \cdot \text{AtRpp38p}) / c(\text{AtRpp38p})$;

$R/C_L = c(\text{MRPR1} \cdot \text{AtRpp38p}) / c(\text{AtRpp38p}) * c(\text{MRPR1})$

$c(\text{AtRpp38p})$	Geradengleichung	n	k_s
$0,127 \mu\text{M}$	$y = -17,75x + 7,13$	0,4	$0,06 \mu\text{M}$
$0,13 \mu\text{M}$	$y = -10,18x + 4,22$	0,4	$0,1 \mu\text{M}$
$0,32 \mu\text{M}$	$y = -1,57x + 2,1$	1,3	$0,64 \mu\text{M}$

Für die Bindungskurven in der Darstellung nach Hanes wird eine Kurvenschar mit gleichem Anstieg erwartet. Auffällig ist der flache Anstieg der Werte mit der hohen Proteinkonzentration $c(\text{AtRpp38p}) = 0,32 \mu\text{M}$ im Vergleich mit den anderen Kurven. In dieser Darstellung wird eine Bindungszahl von $n = 0,5$ ermittelt, die das Ergebnis der Scatchard-Analyse bestätigt. Für die Kurve mit der Proteinkonzentration $0,32 \mu\text{M}$ wird das Ergebnis ebenfalls bestätigt ($n = 1$). Die Gleichgewichtskonstante im Bereich $k_s = 0,1 - 0,4 \mu\text{M}$ deutet auf eine schwache Bindung hin.

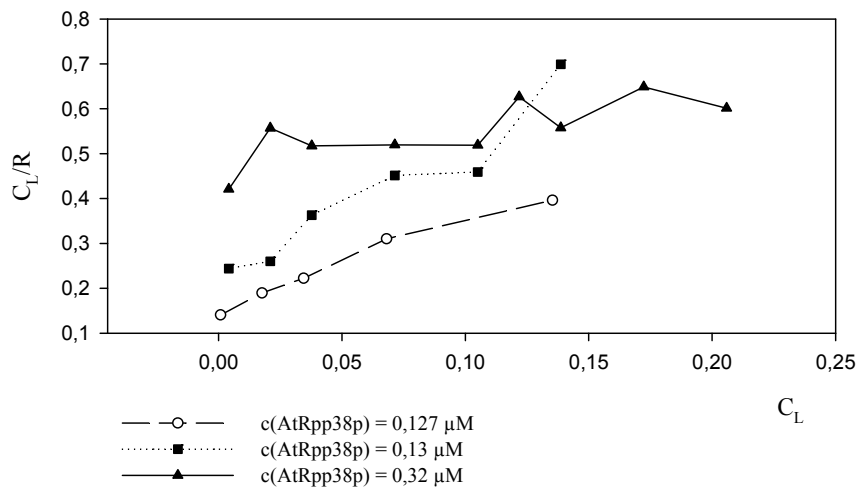


Abb. 61: Lineare Darstellung der Bindungswerte von MRPR1 an AtRpp38p nach Hanes

Aus den Geraden leiten sich folgende Bindungskonstanten ab. $C_L = c(\text{MRPR1})$;

$$C_L/R = c(\text{AtRpp38p})/c(\text{MRPR1} \cdot \text{AtRpp38p})$$

c(AtRpp38p)	Geradengleichung	n	ks
0,127 μM	$y = 1,88x + 0,16$	0,53	0,08 μM
0,13 μM	$y = 2,37x + 0,24$	0,42	0,1 μM
0,32 μM	$y = 1,1x + 0,44$	0,91	0,4 μM

4.5.4.3 Bindung von AtRpp38p an MRPR-Varianten und pre-tRNA

Um zu untersuchen, in welcher Region der MRP RNA die Bindung durch AtRpp38p stattfindet, wurde die RNA-Struktur durch Deletion bestimmter Sequenzabschnitte verkürzt (Tab. 3, Seite 101). Abb. 62 zeigt, dass AtRpp38p an die C-Domäne der MRPR1 (MRPR1-1) bindet. Dieser Komplex konnte in Gelen mit 0,5 x TB und 0,5 x TG als Puffersystem analysiert werden. Im direkten Vergleich dazu konnte gezeigt werden, dass AtRpp38p auch an die S-Domäne der MRPR1 (MRPR1-3) bindet. Die Bindung ist aber schwächer als mit der C-Domäne. Der Bindungsversuch mit Helix P3 der MRPR1 (MRPR1-4) beweist, dass dieses Strukturmotiv allein als Bindungspartner für AtRpp38p nicht ausreicht. Die Reaktion mit dem RNase P-Substrat (pre-tRNA^{Tyr} aus *N. tabacum*) zeigt ein regelmäßiges Bandenmuster (Abb. 62, Probe 11, Pfeile). AtRpp38p bindet auch an MRPR2 (Abb. 62, Probe 7).

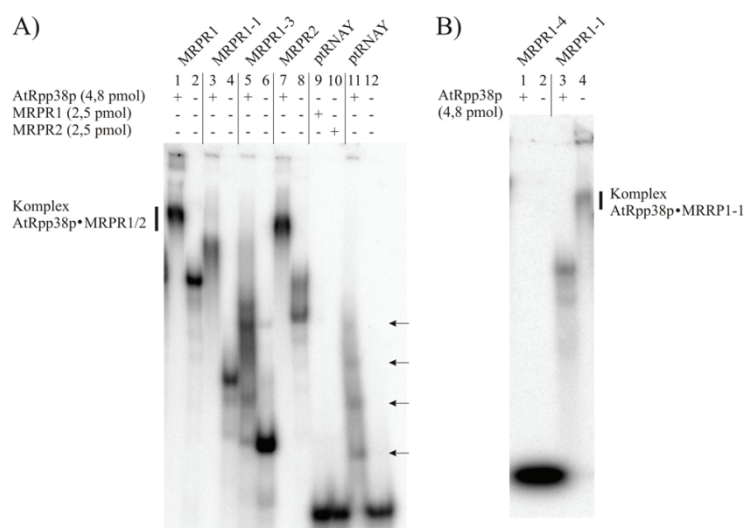


Abb. 62: Komplexbildung von AtRpp38p mit MRPR-Varianten sowie pre-tRNA^{Tyr}

Für die Bindungsreaktion wurden je 10000 cpm der radioaktiven Transkripte mit 4,8 pmol AtRpp38p für 30 min bei 25 °C, 350 Upm inkubiert. Die Position der Komplexe von AtRpp38p mit MRPR1, MRPR2 in A) und mit MRPR1/C-Domäne in B) sind durch Linien am Rand markiert. Pfeile markieren die Komplexe von AtRpp38p mit pre-tRNA^{Tyr}. Gelbedingungen: 5,6 % PAA-Gel (29:1, AA:BisAA), 0,5 x TG.

A) Probe 1, 2: MRPR1 (34,5 fmol; 264 Nt); 3, 4: MRPR1-1/C-Domäne (45,5 fmol; 153 Nt); 5, 6: MRPR1-3/S-Domäne (67,4 fmol; 125 Nt); 7, 8: MRPR2 (26,7 fmol; 268 Nt); 9, 10, 11, 12: pre-tRNA^{Tyr} aus *N. tabacum* (93,6 mol; 82 Nt).

B) Probe 1, 2: MRPR1-4/P3 (337 fmol; 31 Nt); 3, 4: MRPR1-1/C-Domäne (45,5 fmol; 153 Nt).

4.5.4.4 Komplexbildung zwischen AtRpp38p, MRPR1 und pre-tRNA^{Tyr}

Eine Bindung des Proteins an pre-tRNA ist in dem 0,5 x TB-Puffersystem möglich, wird jedoch bei Zugabe eines Überschusses unmarkierter MRPR1 wieder aufgehoben (Abb. 63, Probe 2 und 3, Komplex 1). Probe 4 zeigt, dass dieser Effekt nicht auf der Bindung der pre-tRNA an die MRPR1, sondern an AtRpp38p beruht. Eine direkte Interaktion zwischen den beiden RNAs konnte nicht eindeutig gezeigt werden (Abb. 62, Proben 9 und 12; Abb. 63, Probe 4, 5 und 6). Ebenso konnte eine Bindung zwischen MRPR2 und pre-tRNA^{Tyr} nicht nachgewiesen werden (Abb. 62, Proben 10, 12). Die Proben 7 und 9-11 in Abb. 63 zeigen die Bildung heterogener Komplexe aus pre-tRNA, MRPR1 und AtRpp38p, die ein geringfügig anderes Laufverhalten als AtRpp38p-MRPR1-Komplexe (Probe 8) zeigen. Das schwache Signal der freien pre-tRNA und das Fehlen der freien MRPR1 wird dabei durch ein verstärktes Signal im Protein-RNA-Bindungskomplex begleitet (Vergleich Probe 5 und 7).

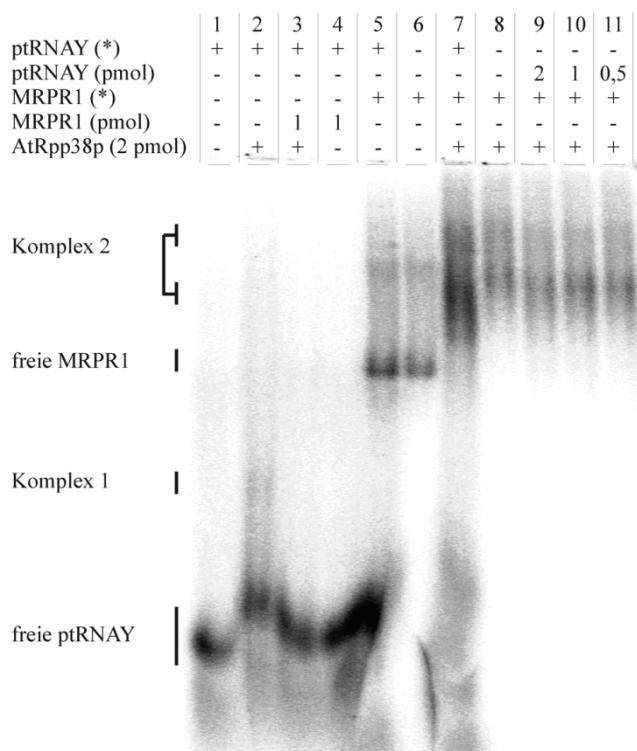


Abb. 63: Bindungsverhalten von AtRpp38p und MRPR1 in Gegenwart von pre-tRNA^{Tyr}

Komplexe wurden auf einem 5,6 % PAA-Gel (29:1, AA:BisAA), 0,5 x TB analysiert. Das Gel (40 x 20 cm) wurde in der Abbildung auf 50 % der Länge gestaucht. ptRNAY(*): je 76,4 fmol ³²P-markierte pre-tRNA^{Tyr}; MRPR1(*): je 32,6 fmol ³²P-markierte MRPR1.

Komplex 1: MRPR1 und AtRpp38p;

Komplex 2: pre-tRNA, MRPR1 und AtRpp38p.

4.5.5 Untersuchung der Bindung von AtRpp30p und MRP RNA

Eine Bindung zwischen Rpp30p und den *Ath* RNase MRP RNAs konnte in Polyacrylamidgelen nur schlecht nachgewiesen werden. Sowohl in TB- als auch in TG-gepufferten Gelen bildeten sich unlösliche Aggregate, die teilweise bis zu 100 % der radioaktiv markierten RNA in der Tasche des Gels zurückhielten. Da AtRpp30p im Gegensatz zu den anderen untersuchten Proteinen einen niedrigen isoelektrischen Punkt (pI = 5) besitzt, sollte es im gewählten Puffersystem (pH 8,3) negativ geladen sein und ein Einwandern in das Gel ermöglichen. Das hohe Molekulargewicht von rekombinantem AtRpp30-0p (73,7 kDa), MRPR1 (83,4 kDa) und MRP 2 (83,1 kDa) bzw. des Komplexes aus diesen Komponenten könnte der Grund für die Ansammlung in der Tasche sein. Daher wurde die kleinere MRPR1-1 (C-Domäne, 153 Nt) mit AtRpp30-0p zur Komplexbildung gebracht. Wie in Abb. 64 dargestellt ist, wird ein löslicher Komplex aus AtRpp30-0p und der kurzen MRPR1-1 ausgebildet, der nur im 0,5 x TG-Puffersystem analysiert werden konnte.

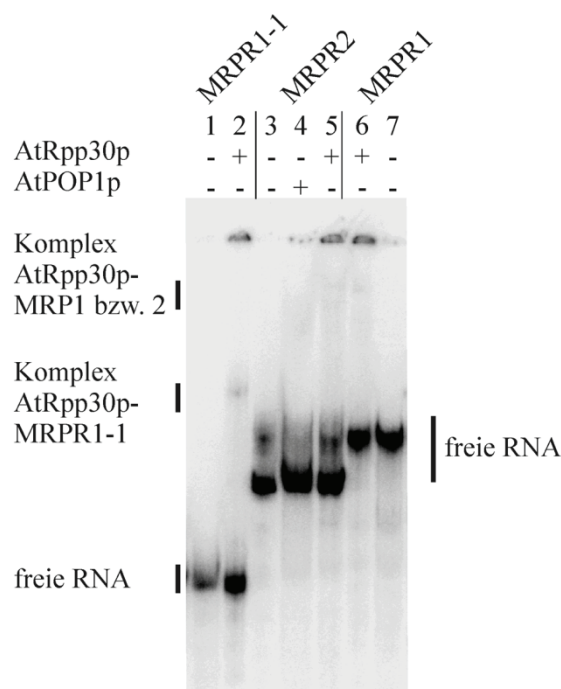


Abb. 64: Komplexbildung von AtRpp30p mit MRPR-Varianten

Für die Bindung wurden je 2,7 pmol rekombinantes AtRpp30p bzw. 2 pmol rekombinantes AtPOP1p entweder mit 49 fmol MRPR1-1 (MRPR1/C-Domäne), 86,7 fmol MRPR2 oder 24,8 fmol MRPR1 inkubiert. Gelbedingungen: 5,6 % PAA-Gel (0,5 x TG); Bindungspuffer siehe 4.5.3.

4.5.6 Bindung von AtRpp29p an *A. thaliana* RNase MRP RNA

Eine Bindung des Proteins an MRPR1 konnte in den durchgeführten Gelshiftexperimenten weder im Tris-Borat- (TB) noch im Tris-Glycin-Puffersystem (TG) beobachtet werden. Auch die Variierung der Ionenstärke und Supplementierung mit Mg^{2+} (0,35 x/0,5 x/0,75 x TB; 0,5 x/0,75 x TG; 0,75 x TB, 1 mM $MgCl_2$; 0,5 x TG, 1 mM $MgCl_2$) führte zu keiner Komplexbildung.

4.5.7 Untersuchung der Bindung zwischen AtRpp14p und MRPR

Das rekombinante AtRpp14p (Braun, 2007) und *Ath* RNase P/MRP RNAs zeigen nur eine schwache Komplexbildung, die ausschließlich im 0,5 x TG-Gelsystem detektiert werden konnte (Abb. 65). Dieses zu POP5 homologe Protein bindet sowohl an MRPR1 (Probe 5), als auch an MRPR2 (Probe 3). Die C-Domäne der MRPR1 bildet ebenfalls einen Komplex mit AtRpp14p (Probe 1). Bei Verwendung des TB-Puffersystems befanden sich die Komplexe vollständig in den Geltaschen.

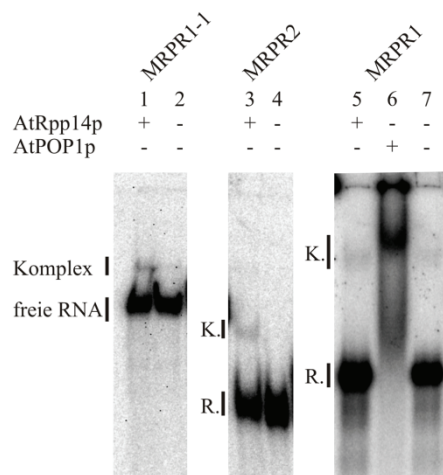


Abb. 65: Komplexbildung von AtRpp14p mit MRPR-Varianten

Für die Bindung wurden je 3,7 pmol rekombinantes AtRpp14p entweder mit 39 fmol radioaktiv markierter MRPR1-1 (MRPR1/C-Domäne, Probe 1), 7,5 fmol MRPR2 (Probe 3) oder 51,8 fmol MRPR1 (Probe 5) inkubiert. Als Vergleich wurden 4 pmol AtPOP1p mit MRPR1 zur Bindung gebracht (Probe 6). Die Reaktionen 5, 6 und 7 mit MRPR1 wurden auf einem separaten Gel analysiert. Gelbedingungen: 5,6 % PAA-Gel (0,5 x TG); Bindungspuffer siehe 4.5.3. K: Komplex; R: freie RNA

4.5.8 Bindung mehrerer Proteine an *A. thaliana* RNase MRP RNA

In weiteren Versuchen sollte gezeigt werden, ob sich die in dieser Arbeit untersuchten RNase P Proteine bei der Bindung an die RNase MRP RNAs gegenseitig beeinflussen können. Dazu wurden verschiedene Kombinationen der Proteine zuerst mit MRPR1 in einem Reaktionsansatz gemischt und anschließend auf einem nativen Polyacrylamidgel analysiert. Abb. 66 zeigt, dass nur eines der beiden zugegebenen Proteine (AtPOP1p) an die RNA binden kann; welches der Proteine das ist, hängt von den Pufferbedingungen ab. Auch die Untersuchung von AtRpp38p in Kombination mit den anderen Proteinen AtRpp14p, AtRpp29p und AtRpp30p im TB-gepufferten Gelsystem zeigte das gleiche Verhalten: es ist nur die Bindung der RNA an AtRpp38p zu erkennen (keine Abbildung). Einen Supershift, wie man ihn bei der Bindung mehrerer Proteine an die RNA erwarten würde, konnte in keinem Fall beobachtet werden.

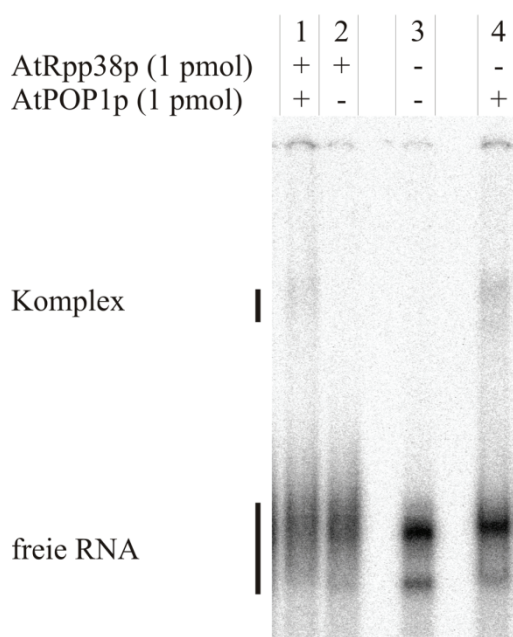


Abb. 66: Kombinierte Bindung von AtRpp38p, AtPOP1p und MRPR1

Die Bindung erfolgt wie in 4.5.3 beschrieben. Die Proteine wurden unmittelbar nacheinander zum Bindungsansatz mit der RNA gegeben und für 30 min, 350 Upm, 25 °C inkubiert. Danach wurde die Bindung auf einem 5,6 % PAA-Gel, 0,5 x TG analysiert.

4.6 Nachweis von RNase P/MRP Proteinen in Pflanzenextrakten

Neben *A. thaliana* sollten für den Nachweis der RNase P/MRP Proteine weitere Pflanzen verwendet werden. Der zu *A. thaliana* nah verwandte Blumenkohl, aus der gleichen Familie der Kreuzblütler, bietet mehrere Vorteile. Durch den geringen Anteil an Chloroplasten im Gewebe enthalten die Proteinextrakte nur einen sehr geringen Anteil an Rubisco (Ribulosebisphosphatcarboxylase). Für die Proteinextraktion ist Blumenkohl sehr gut geeignet, da er nur einen geringen Anteil an Proteasen und Phenoloxidasen enthält. Die nahe Verwandtschaft zu *A. thaliana* lässt vermuten, dass die Proteinsequenzen ähnlich sind. Daher sollen die Ergebnisse der Nachweise der beiden Spezies für diese Pflanzenfamilie repräsentativ sein. Als weitere pflanzliche Spezies wird Weizen verwendet. Die Sequenz des Weizengenoms ist zwar nicht bekannt, doch werden gereinigte Weizenextrakte seit langem als einziges pflanzliches Material für verschiedenste enzymatische Reaktionen eingesetzt (Marcu und Dudock, 1974; Stange und Beier, 1987; Arends und Schön, 1997).

4.6.1 Optimierung der Semi-Dry-Blot-Bedingungen auf eine PVDF-Membran

Der Semi-Dry-Blot wurde wie in 3.7.7 beschrieben durchgeführt. Für einen Nachweis der Proteine war eine Optimierung des Transfers notwendig. Um größere Proteinmengen auftrennen zu können, wurden SDS-Gele mit den Maßen 10 x 13 x 0,1 cm verwendet. Die Dauer der Äquilibration des Gels in Kathodenpuffer vor dem Transfer erwies sich für einen effizienten Transport der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membran als entscheidendes Kriterium. Bei einer Geldicke von 1 mm erwies sich eine verlängerte Äquili-

brierungszeit von 45 min als notwendig. Durch Verlängerung der Transferzeit auf bis zu 240 min bei niedriger Spannung (10-15 V) konnte eine Erhöhung der übertragenen Proteinmenge erreicht werden. Die niedrige Leistung verhindert, dass der Widerstand ansteigt und das Gel sich erwärmt. Bei verlängerten Transferzeiten mussten allerdings die nicht direkt dem Gel oder der Membran benachbarte Filterpapiere gegen frisch äquilibrierte ausgetauscht werden, da die Pufferkapazität beim Semi-Dry-Transfer begrenzt ist. Auf diese Weise kann einerseits die Stromstärke während des gesamten Transfers auf gleichmäßigem Niveau gehalten (ca. 1,5 mA/cm² Gelfläche) und andererseits ein Austrocknen der Membran vermieden werden.

4.6.2 Nachweis von AtPOP1p durch Western Blot

Das entscheidende Kriterium für einen erfolgreichen antikörperbasierten Nachweis des AtPOP1-Proteins in *A. thaliana* war die Einführung einer Methanol-Aceton-Fällung an Stelle einer TCA-Fällung des Proteinrohextrakts. Mit TCA-gefällten Proteinextrakten konnte kein Signal erhalten werden. Die Wahl des Probenpuffers für die SDS-Elektrophorese hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Detektion. Wurde im Probenpuffer Harnstoff und SDS verwendet, zeigte die Übersichtsfärbung mit Ponceau S ein eindeutiges Bandenmuster der pflanzlichen Proteine verglichen mit den diffusen Banden bei Proben mit SDS-Probenpuffer. Eine zufriedenstellende Denaturierung der Proteine im Gesamtproteinextrakt konnte nur durch die Harnstoff-SDS-Mischung erreicht werden. Auch die anschließende Detektion verbesserte sich im Bezug auf das Hintergrundsignal.

Für den immunologischen Nachweis wurden zwei verschiedene Kaninchenserum verwendet, deren Bindungseigenschaften sich deutlich unterschieden. Als Antigen war rekombinantes AtPOP1p nach proteolytischer Entfernung des His₆-Tags und elektrophoretischer Reinigung verwendet worden. Das Serum #2294 zeichnete sich durch eine hohe Spezifität aus, zeigte aber nur geringe Sensitivität. Es wurde als IgG-Präparation in einer Endverdünnung von 1:1500 verwendet und detektierte im Dot-Blot bis zu 1,17 pmol (25 ng) des rekombinanten Proteins (Abb. 67 A). Dieses ist ein Fusionsprotein aus AtPOP1p (151 AS, Exon I) und einem N-terminalen Peptid (36 AS), das die His₆-Affinitätsmarkierung enthält (4.4.2). Das zweite Serum (#2293) wurde direkt verwendet, zeigte eine deutlich höhere Sensitivität und wurde in einer Verdünnung von 1:30000 verwendet. Das rekombinante AtPOP1p konnte im Dot Blot bis 73 fmol (1,56 ng) nachgewiesen werden (Abb. 67 B). Die Verwendung des chemilumineszenten an Stelle des Farbsubstrates bei der Antikörperdetektion wirkte sich nicht verstärkend auf die Sensitivität der Detektion aus. Die Vorbehandlung des Serums mit abgetöteten, unlöslichen *E. coli*-Zellen (mit dem Expressionsvektor pRSET-A), erhöhte die Spezifität des Serums (3.7.10.1). Vor der Behandlung konnte mit diesem Serum neben dem

Antigen AtPOP1p auch rekombinantes AtRpp29p, AtRpp38p und ein Kontrollprotein mit His₆-Tag detektiert werden, nach der Behandlung wurde keines dieser Proteine mehr detektiert (siehe Anhang, Tab. 13).

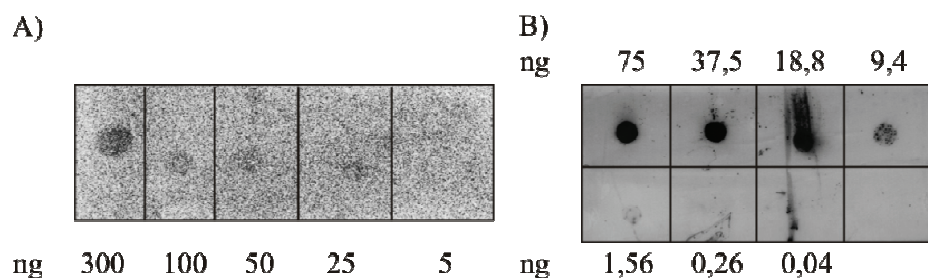


Abb. 67: Dot-Blot von AtPOP1p

Die Detektion erfolgte mit dem AtPOP1p-spezifischen Serum #2294 (A) bzw. #2293 (B) und einem Kaninchenspezifischen Sekundärantikörper, der an Alkalische Phosphatase gekoppelt war. Das Substrat war chemolumineszierendes CSPD (A) bzw. der Indolfarbstoff NBT/BCIP (B). Mit dem Serum #2294 konnten 25 ng (A), mit Serum #2293 sogar 1,56 ng (B) des rekombinanten Proteins detektiert werden.

Mit der Präparation #2294 (*E. coli* behandelt) wurde im Proteinextrakt von *A. thaliana* die schwache Bande eines Proteins von ca. 32 kDa (Abb. 68, Probe 3, Pfeil) und in Weizen ein etwas größeres Protein von ca. 35 kDa detektiert (Abb. 68, Probe 4). Aufgrund des in 4.3.1 und 4.3.1.2 ermittelten Spleißmusters von AtPOP1p wird in *A. thaliana* eine Proteinbande von 34,6 kDa erwartet. Der rechte Teil des Blots wurde mit Präimmunserum (1:1500) inkubiert. Dabei konnten keine der in Extrakten aus Weizen und *A. thaliana* aufgetretenen Banden nachgewiesen werden (Abb. 68, Probe 5, 6), was die Spezifität der erhaltenen Signale bestätigt. Im Blumenkohlextrakt (Probe 2, 7) konnte dagegen kein spezifisches Signal eindeutig zugeordnet werden, da mit Präimmunserum ein vergleichbares Muster erhalten wurde. Mit Serum, das zur Kontrolle mit rekombinantem AtPOP1p vorbehandelt wurde (Depletierung von AtPOP1p-spezifischen Antikörpern), konnte kein Signal mehr detektiert werden. Um zu überprüfen, ob die Detektion mit dem AtPOP1p-spezifischen Serum #2294 auch für Blumenkohl anwendbar ist, wurde eine separate Western Blot Analyse des S23-Blumenkohlextraktes mit verschiedenen Proteinmengen durchgeführt. In diesen wurde im Blumenkohlextrakt ebenfalls eine entsprechende Bande bei ca. 30 kDa (Abb. 69, Pfeil) detektiert.

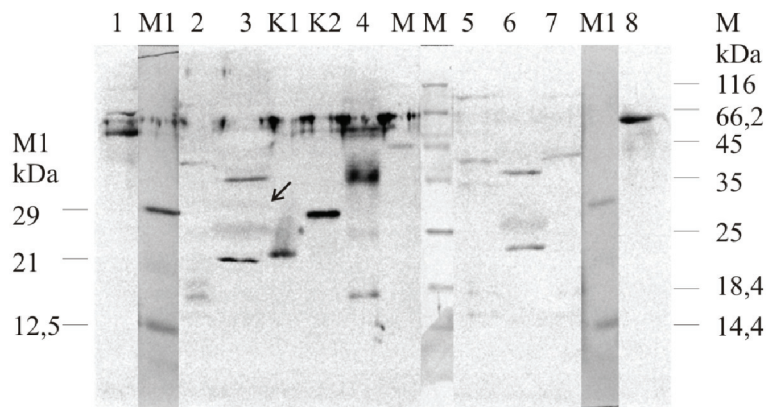


Abb. 68: Western Blot Analyse verschiedener Zellextrakte mit AtPOP1p-AK

Die Proben wurden in Harnstoffprobenpuffer gekocht, auf einem denaturierenden 13 % PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membranhälfte mit den Proben 1-4 wurde mit AtPOP1p-spezifischen IgG (#2294, 1:1500) inkubiert, die Proben 5-8 mit Präimmunserum (#2294; 1:1500). Die Detektion erfolgte mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (Pierce, 1:2500) und Luminol. Der Pfeil markiert das in *A. thaliana* detektierte Signal. 1, 8: Humane Kernfraktion (35 µg); 2, 7: Blumenkohl (S23; 43 µg); 3, 6: *A. thaliana* (35 µg); 4, 5: Weizenkeim (S23; 33 µg); K1: AtPOP1p (0,42 µg; 21,4 kDa); K2: AtPOP1ΔIp (0,66 µg; 25,6 kDa); M: Fermentas Unstained Protein Molecular Weight Marker (Ponceau S gefärbt); M1: Serva Low Molecular Weight Marker (Ponceau S gefärbt).

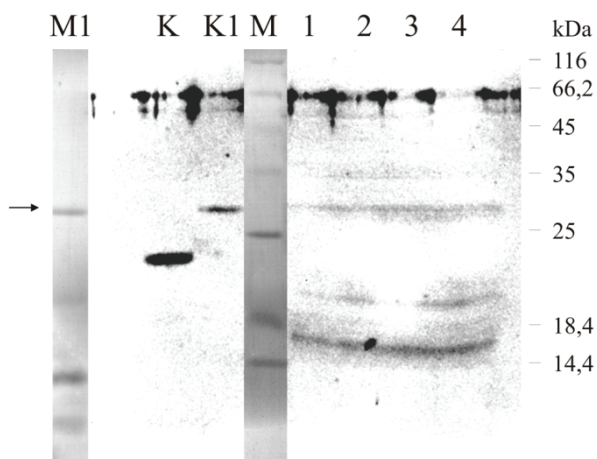


Abb. 69: Western Blot Analyse von Blumenkohl-Extrakt mit AtPOP1p-spezifischen Antikörpern

Die Proteinproben wurden auf einem 13 % PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit AtPOP1p-spezifischen IgG (#2294, 1:1500) und HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (Pierce, 1:2500). Als Substrat wurde Luminol verwendet. 1-4: Blumenkohl (S23; 35 µg; 70 µg; 105 µg; 140 µg); K: AtPOP1p (0,3 µg; 21,4 kDa); K1: AtPOP1ΔIp (0,3 µg; 25,6 kDa); M: Fermentas Unstained Protein Molecular Weight Marker (Ponceau S-Färbung); M1: Serva Low Molecular Weight Marker (Ponceau S-Färbung).

Die Identität der Signale sollte mit dem zweiten Serum (#2293) bestätigt werden. Im Western Blot wurden bei allen verwendeten pflanzlichen Proteinextrakten mit diesem Serum mehrere Signale mit höherem Molekulargewicht detektiert. Mit diesem Serum konnte in *A. thaliana* eine Bande von 34 kDa und 100 kDa nachgewiesen werden, die nicht im Präimmunserum und mit AtPOP1p-depletiertem Serum detektierbar waren (Abb. 70, Pfeile). Um das schwache Signal in *A. thaliana* erkennen zu können, musste die Spur mit dem Weizenkeimextrakt überfärbt werden. In Rucola (*Eruca sativa*) und Kresse (*Lepidum sativum*) konnte eine Bande mit der Größe des Weizenproteins (~ 40 kDa, Spur 7 und 8) nachgewiesen werden. In dem Bereich der Banden von *A. thaliana* (30-34 kDa) war in diesen Proteinextrakten keine Bande

sichtbar. Alle Banden im Bereich der rekombinanten Kontrollproteine AtPOP1p und AtPOP1ΔIp (ca. 25-30 kDa), die zunächst als POP1-Homolog identifiziert wurden, waren unspezifische Kreuzreaktionen, da AtPOP1p-depletiertes Serum dieser Banden detektierte.

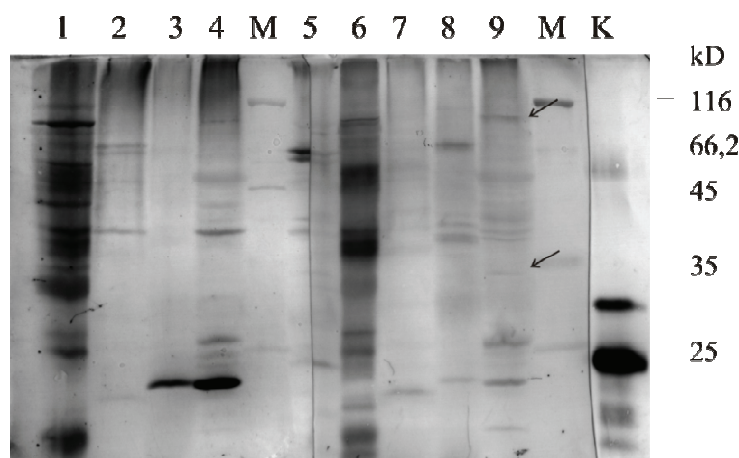


Abb. 70: Nachweis von POP1p-Homologen in verschiedenen Pflanzenextrakten durch Western Blot

Die Proben wurden auf einem 13 % PAA-SDS-Gel aufgetrennt und durch Semi-Dry-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membranhälfte mit den Proben 1-5 wurde mit Präimmunsrum (#2293, 1:30000) inkubiert, die Proben 5-8 mit AtPOP1p-spezifischem Serum (#2293, 1:30000). Die Probe 5 wurde in der Mitte geteilt. Die Detektion erfolgte mit Phosphatase-gekoppeltem Sekundärantikörper (Sigma, 1:10000) und dem Substrat NBT/BCIP. Die Pfeile markieren die in *A. thaliana* detektierten spezifischen POP1-Signale. Die Banden mit Weizenkeimextrakt sind überfärbt. 1,6: Weizenkeim (S23; 5,8 µg); 5: Blumenkohl (S23; 34 µg); 2,7: Kresse (48,75 µg); 3,8: Rucola (36,25 µg); 4,9: *A. thaliana* (16,25 µg); K: rekombinantes AtPOP1p (18,4 ng) und AtPOP1ΔIp (20,6 ng); M: Fermentas Unstained Protein Molecular Weight Marker (Ponceau S gefärbt).

Die mit Gesamtproteinextrakten aus *A. thaliana* erhaltenen Ergebnisse sollten zusätzlich in AtPOP1p-spezifischen Immunopräzipitaten bestätigt werden, da mit dieser Methode eine Anreicherung der POP1-Homologen und damit eine Signalverstärkung erreicht werden kann. In diesem Experiment wurde das Pierce Crosslink Immunoprecipitation Kit verwendet und insgesamt 1,17 mg Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Diese Analyse zeigt neben den beiden bekannten Proteinen mit 34,6 kD und 92,6 kD zwei weitere Banden bei ca. 75 kD und 150 kD (Abb. 71, Pfeile). Trotz Crosslink wird auch IgG in der Elutionsfraktion detektiert.

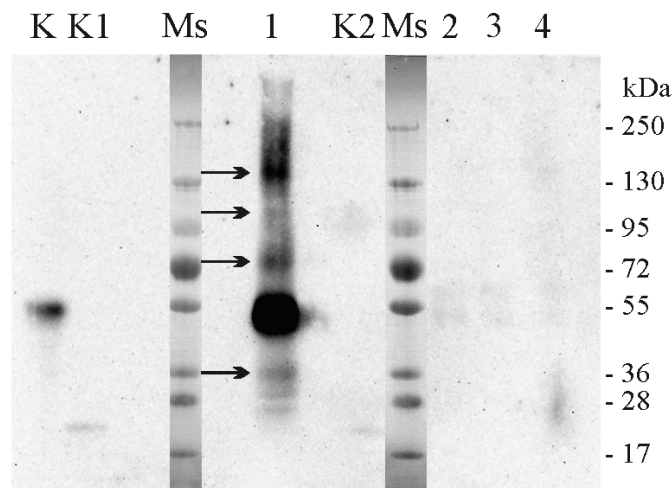


Abb. 71: Nachweis von POP1-Homologen in präzipitiertem *A. thaliana*-Proteinextrakt

Die Proben wurden auf einem 8-14 % PAA-Gel (29:1, AA:BisAA) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Membran wurde mit AtPOP1p-spezifischem Serum (#2293, 1:30000) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Sigma, 1:10000) und dem Substrat ECL Plus. Die Pfeile markieren die in *A. thaliana* detektierten POP1-Signale. K: α AtPOP1-IgG-Kontrolle (0,015 μ l Serum); K1: rekombinantes AtPOP1p (30 ng); K2: rekombinantes AtPOP1p, AtRpp38s, AtRpp29p, AtRpp30-0p (je 37,5 ng); 1: *A. thaliana* Immunopräzipitat; 2-4: Waschfraktionen; Ms: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas).

4.6.3 Nachweis von AtRpp30p im Western Blot

Für das spezifische Serum (4.4.2.2) wurde im Dot-Blot die maximale Verdünnung von 1:2000 ermittelt. Dabei konnte das Antigen AtRpp30-0p in einer Menge von 28 fmol (2,29 ng) noch gut detektiert werden. Die aus RACE-Experimenten zu erwartenden Proteine, die den drei mRNA-Varianten entsprechen, haben eine Größe von 64,1 kDa (Spleißvariante 1); 75,3 kDa (Spleißvariante 2) und 79,3 kDa (Variante 3; 4.3.2.3). Im Western Blot wurden in *A. thaliana*, Blumenkohl und Weizen starke Signale bei einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa erhalten, das nicht bei der Detektion mit Präimmunserum erscheint (Abb. 72, Spur 2 und 7). Eine Depletion der Antikörper mit AtRpp30-0p konnte das Signal nicht aufheben, so dass nach einem anderen spezifischen Signal gesucht werden muss. Dabei muss das ungewöhnliche Laufverhalten des Proteins berücksichtigt werden, wie es in 4.4.2.1 beobachtet wurde. So konnten in *A. thaliana* drei schwache Proteinbanden (Pfeile) mit den Molekulargewichten 97 kDa, 93 kDa und 73 kDa detektiert werden, die dem unter 4.3.2.3 beschriebenen Spleißmuster mit den Proteingrößen 79,3 kDa, 75,3 kDa und 64,1 kDa entsprechen könnten.

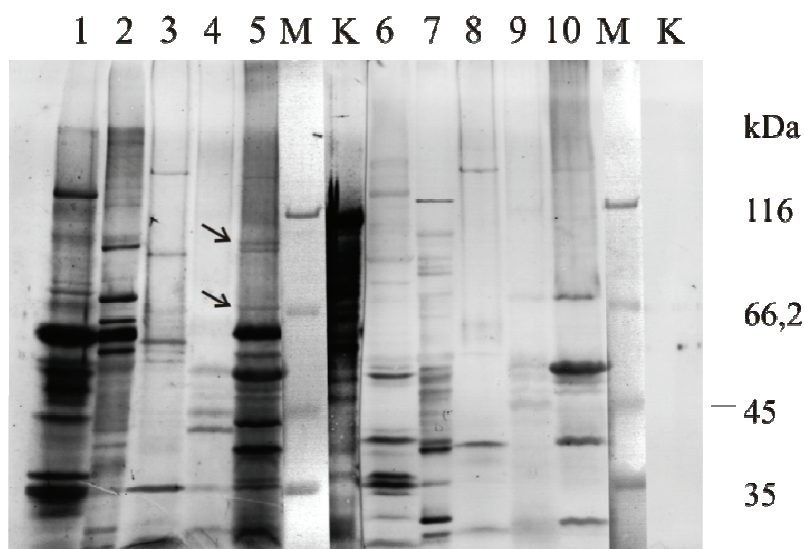


Abb. 72: Nachweis von Rpp30p-Homologen in verschiedenen Pflanzenextrakten durch Western Blot

Proteinextrakte wurden auf einem 11 % PAA-Gel (37,5:1, AA:BisAA) aufgetrennt und durch Semi-Dry-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit AtRpp30p-spezifischem Serum (1-5) bzw. Präimmunserum (#0001, 1:2000, 6-10) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpern und dem Substrat NBT/BCIP. Die spezifischen Signale sind mit Pfeilen markiert. 1, 6: Blumenkohl (S23; 24 µg); 2, 7: Weizenkeim (S23; 11 µg); 3, 8: Kresse (49 µg); 4, 9: Rucola (36 µg); 5, 10: *A. thaliana* (16 µg); K: *E. coli*-Lysat mit AtRpp30-0p (78 kDa); M: Fermentas Unstained Protein Molecular Weight Marker (Ponceau S gefärbt)

4.6.4 Nachweis von AtRpp38p durch Western Blot

Das exprimierte und gereinigte rekombinate AtRpp38p (167 Aminosäuren) hat eine berechnete Molekülmasse von 23 kDa. Im SDS-Gel erscheint es aber mit einer Molmasse von ca. 26 kDa (4.4.2.3). Das native Protein ohne His₆-Tag mit einem Molekulargewicht von 18,9 kDa würde demnach bei ca. 22 kDa erwartet.

In Vorversuchen zum Western Blot mit verschiedenen Pflanzenextrakten zeigte sich nur der PBS-Puffer für die Antikörper als geeignet, während mit TBS keine Detektion möglich war. Für Dot-Blots und Western Blots wurde mit *E. coli*-Lysat vorbehandeltes (3.7.10.1) anti-AtRpp38p-Serum eingesetzt und eine optimale Verdünnung von 1:20000 ermittelt. In den durchgeführten Dot-Blots und Western Blots stellte sich heraus, dass der Antikörper trotz Vorbehandlung in der Lage ist, neben dem rekombinanten AtRpp38p auch rekombinantes AtPOP1p und AtRpp29p zu detektieren (siehe Anhang, Tab. 13). Im Western Blot mit den pflanzlichen Proteinextrakten wurden vier Banden in *A. thaliana* (22,5; 26,5; 37; 44 kDa), drei Banden in *T. aestivum* (26,5; 29; 54 kDa, Weizen) und drei Banden in *B. napus* (26,5; 40; 54 kDa, Blumenkohl) detektiert (Abb. 73).

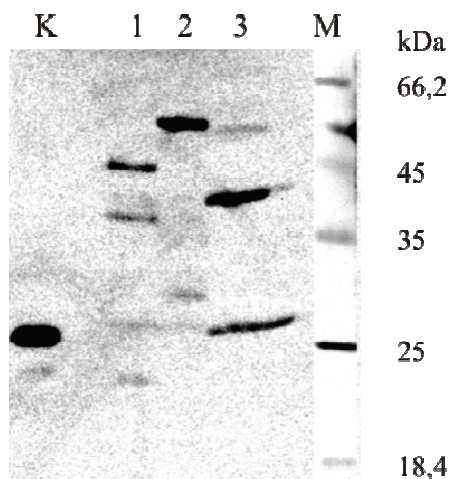


Abb. 73: Detektion von Rpp38p-Homologen in Pflanzenextrakten durch Western Blot

Proteinextrakte wurden auf einem 12,5 % PAA-Gel aufgetrennt und durch Semi-Dry-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit AtRpp38p-spezifischem Serum (#3706, 1:20000) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern und Luminol. 1: *A. thaliana* (34 µg); 2: Weizenkeim (S23; 65 µg); 3: Blumenkohl (S23; 72 µg); K: rekombinantes AtRpp38p (25,5 ng; 23 kDa); M: Fermentas Unstained Protein Molecular Weight Marker (Ponceau S gefärbt).

4.6.5 Nachweis von AtRpp29p durch Western Blot

Das rekombinante Protein AtRpp29p hat eine berechnete Molekülmasse von 37,4 kDa (32,9 kDa natives Protein ohne His₆-Tag) und erscheint im SDS-Gel mit einer Molmasse von ca. 40 kDa. Für das hier verwendete Serum wurde in Vorversuchen eine optimale Verdünnung von 1:12000 ermittelt. Das Serum wurde vor Verwendung mit *E. coli*-Lysat vorbehandelt (3.7.10.1). Dadurch wurde die Detektion von rekombinantem AtPOP1p, AtRpp38p und AtRpp30p im Dot-Blot beseitigt (siehe Anhang, Tab. 13). Spezifische Signale konnten außer in *A. thaliana* auch in den Extrakten von Weizen, Rucola, Kresse sowie Blumenkohl nachgewiesen werden. Neben starken unspezifischen Signalen wird in *A. thaliana* ein spezifisches Signal bei 37 kDa detektiert, das bei der Analyse mit Präimmunserum nicht vorhanden ist (Abb. 74, Pfeil in Probe 1). Im nah verwandten Rucola (Probe 2) konnte keine Bande mit ähnlicher Größe gefunden werden, dagegen aber in Kresse und Weizen (Pfeile Probe 3, 5). Auffällig ist das starke Signal im Proteinextrakt von *A. thaliana* bei 56 kDa und von Blumenkohl bei 45 kDa. Diese beruhen aber nicht auf der Erkennung durch AtRpp29p-spezifische Antikörper, da mit dem rekombinanten Protein AtRpp29p vorbehandelte Antikörper immer noch diese Signale geben.

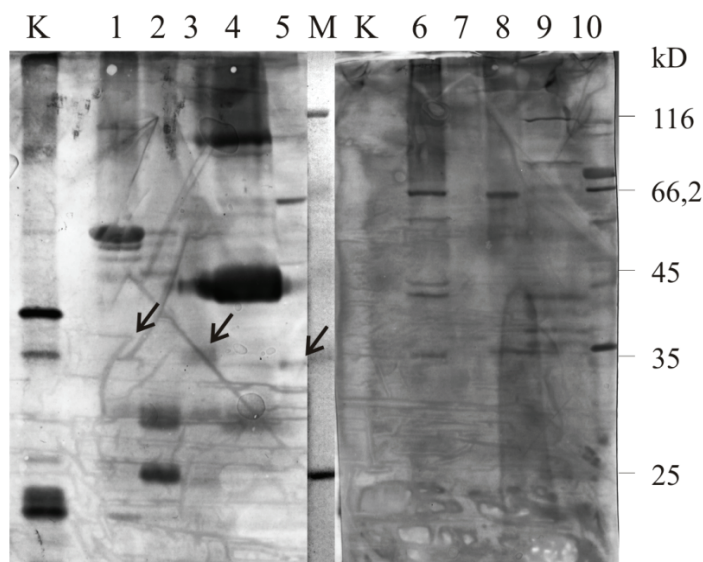


Abb. 74: Nachweis von Rpp29p-Homologen in pflanzlichen Proteinextrakten durch Western Blot

Proteinextrakte wurden auf einem 12,5 % PAA-Gel aufgetrennt und durch Semi-Dry-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit AtRpp29p-spezifischem Serum (1-5) bzw. Präimmunserum (#1043, 1:12000, 6-10) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Phosphatase-gekoppelten Sekundäntikörpern und NBT/BCIP.

1, 6: *A. thaliana* (16 µg); 2, 7: Rucola (36,2 µg); 3, 8: Kresse (48,6 µg); 4, 9: Blumenkohl (S23; 24 µg); 5, 10: Weizenkeim (S23; 11,4 µg); K: rekombinantes AtRpp29p (25 ng; 37,4 kDa); M: Fermentas Unstained Protein Molecular Weight Marker (Ponceau S-Färbung).

4.7 Identifikation von RNase MRP RNAs in anderen Pflanzen

Um eine Übersicht über die Strukturen möglicher RNase MRP RNAs in anderen Pflanzen zu gewinnen, wurden homologe Sequenzen in den Genomen von *Vigna radiata* (Mungbohne), *Triticum aestivum* (Weichweizen), *Brassica rapa* var. *pekinensis* (Chinakohl) und *Nicotiana tabacum* var. *Samsun* (Tabak) durch bioinformatische Methoden identifiziert und durch PCR isoliert. Aus einer Präparation pflanzlicher genomischer DNA (3.1.6) wurde zunächst eine PCR mit einem Primerpaar für die Bereiche CRI und CRV durchgeführt. Die hohen Sequenzidentitäten dieser konservierten Bereiche der RNase MRP RNA in bekannten eukaryotischen Organismen dienten als Grundlage für das Primerdesign.

Mit dem gewählten Primerpaar (5'PlantMRP-CRI, 3'PlantMRP-CRV-antiW) wurden Amplifikate aus der genomischen DNA von Chinakohl, Weichweizen, Mungbohne und Tabak gewonnen (Abb. 75) und nach elektrophoretischer Reinigung kloniert. Die erhaltenen Klone (TOP10) wurden mit Kolonie-PCR (3.3.1.1) und anschließender Restriktionsanalyse (3.5.1) zur Größenbestimmung des Inserts getestet.

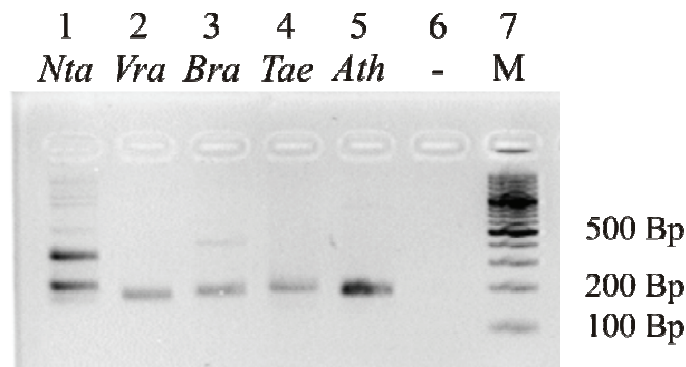


Abb. 75: Amplifikation von homologen RNase MRP RNA-Sequenzen aus genomischer DNA verschiedener Pflanzen

Aus der genomischen DNA verschiedener Pflanzen wurden mit Primern für die hoch konservierten Sequenzbereiche von RNase MRP RNAs (CRI und CRV) Produkte von ca. 200 Bp amplifiziert. *Ath*: *Arabidopsis thaliana*, *Bra*: *Brassica rapa*, *Nta*: *Nicotiana tabacum*, *Tae*: *Triticum aestivum*, *Vra*: *Vigna radiata*, Probe 6: Kontrolle ohne DNA, M: 100 Bp (Fermentas).

Die Sequenzierung der Klone für Mungbohnen-MRPR (*Vigna radiata*) ergab, wie bei *A. thaliana*, zwei Varianten, die ebenfalls nur geringe Unterschiede aufweisen. Die Sequenzierungen der RNase MRP RNA-Kandidaten im Chinakohl (*B. rapa* var. *Pekinensis*) und Weizen (*T. aestivum*) ergab je nur einen Sequenztyp. Die Sequenz der RNase MRP RNA im Chinakohl weicht von der bisher bekannten Variante ab. In Tabak (*N. tabacum* var. *Samsun*) wurden zwei Sequenzen identifiziert, von denen eine die Sequenz eines ESTs (AM840529; Lein et al., 2008) bestätigt, die andere von dieser EST-Sequenz und der von Kiss et al. (1992) abweicht.

Die neuen Sequenzen ermöglichten eine zuverlässigere Berechnung der RNase MRP RNA-Strukturen als die bisherige allein auf Energieoptimierung zielende Methode. Die Strukturmodellierung wurde mit Mfold (Version 3.2, Zuker 2003) durchgeführt. Der Vergleich von Sequenzen aus Raps, Chinakohl und anderen bekannten Sequenzen höherer Pflanzen enthüllte dabei neue strukturelle Eigenschaften (Abb. 76). So war die bisherige Struktur der Helixregion P3 in *Brassicaceae* (Kreuzblütlerartige, z.B. *Arabidopsis*, *Brassica*, *Boechera*, *Eruca*) mit einem internen Loop der Sequenz UCC ausgestattet, der endständige Tetraloop CUUG hatte keinerlei Übereinstimmung mit dem bekannten Konsensus. Die neue Struktur ermöglicht einen Stamm mit der internen Loopsequenz AUAU und einem gegenüberliegenden ungepaarten C. Dadurch ändert sich auch die Sequenz des endständigen Loops in GUCY, der in dieser Familie konserviert ist.

Charakteristisch ist die Länge der Helix P3-Region innerhalb einer Pflanzenfamilie. Während Gräser wie Weizen und Reis (*T. aestivum*; *O. sativa*, *H. vulgare*, *S. bicolor*) eine kurze Helix

aus 4 Basenpaaren mit einem terminalen Loop (8 Basen) ausbilden (Abb. 78), haben alle Kreuzblütler eine längere Helix mit dem erwähnten internen Loop.

Ein anderes Novum ist die konservierte Ausbildung einer Helix P5/7 sowie einer eP15-Helix, die aber nur in einer von zwei Varianten in *A. thaliana* und Mungbohne und in der einzigen Sequenz von Chinakohl existiert.

Auch für die Region P12 konnten spezielle sequenzielle und strukturelle Eigenschaften determiniert werden. Spezies der *Brassicaceae* bilden einen Loop aus (Vergleich Abb. 76 mit Abb. 84), bei dem die konservierten Elemente CRII und CRIII ungepaart vorliegen, so wie es in eukaryotischen RNase P RNAs konserviert ist.

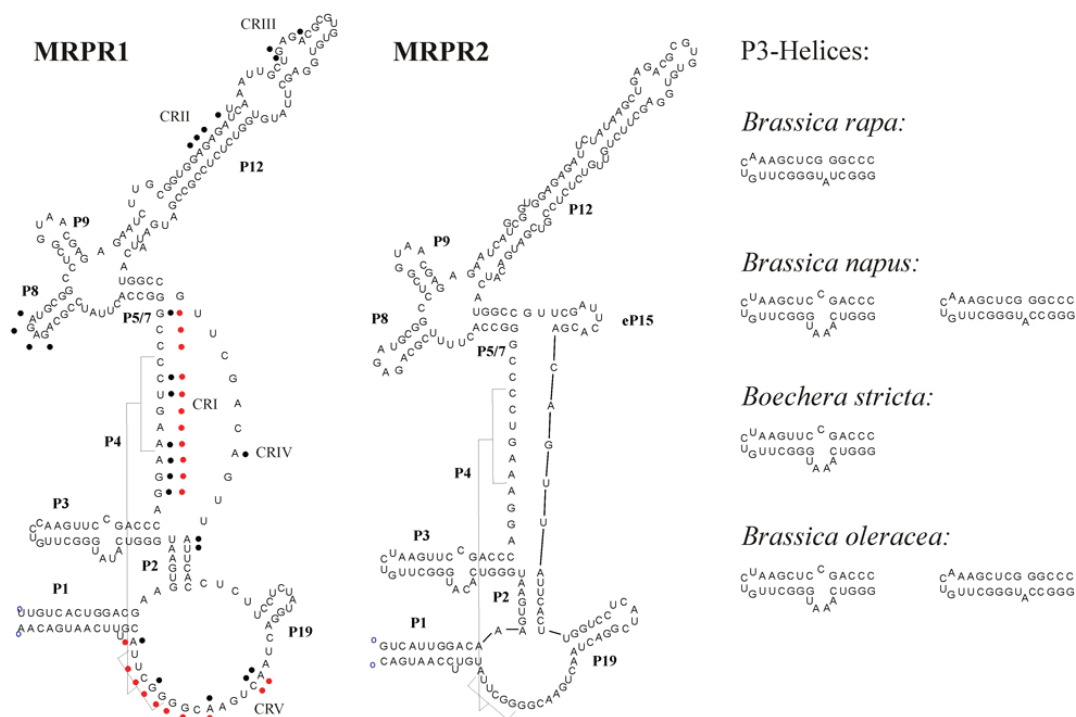


Abb. 76: Sekundärstrukturen der *A. thaliana* RNase MRP RNAs

Die Sekundärstrukturen wurden mit Mfold V3.2 erstellt. Da für *B. oleracea* (Kohl) und *B. napus* (Raps) je zwei RNase MRP RNAs bekannt sind, wurden die P3-Helices der beiden RNAs modelliert. •: konservierte Basen der RNase P RNAs nach Piccinelli et al., 2005 (CRI, CRV) und Marquez et al., 2005 (CRII-CRIV); •: konservierte Basen der RNase MRP RNAs nach Piccinelli et al., 2005 (CRI, CRV). MRPR1: $\Delta G = -70,64$ kcal/mol, MRPR2: $\Delta G = -74,52$ kcal/mol.

4.7.1 Analyse der MRP RNA aus Weizen

Da der Weizenkeimextrakt als biochemisches Standardsystem für die tRNA-Prozessierung dient, jedoch bisher keinerlei Sequenzinformation für RNase MRP RNAs bekannt waren, wurde die vollständige Sequenz dieser RNAs ermittelt, die im Folgenden mit TaMRP (Gen/DNA) bzw. TaMRPR (RNA) bezeichnet werden. Die unter 4.7 ermittelte genomische Sequenz sollte durch eine Analyse der RNA-Transkripte ergänzt werden. Dazu wurde zuerst das 5'-Ende der TaMRPR in Weizen bestimmt (3.4.4.3). Für die Herstellung der cDNA wurde größenfraktionierte RNA (3.1.7.2, Schön et al., 1989) in einer Reversen Transkription mit dem Primer PlantMRP-CRV-antiW und AMV-RTase eingesetzt. Die cDNA wurde polyadenyliert (3.4.4.3) und für die Amplifikation mit den Primerpaaren Anker2 + WG-MRP1-anti und UAP + WG-MRP2-anti eingesetzt. Das Produkt der zweiten PCR hatte eine Länge von etwa 200 Bp, wurde mit pCRII TOPO ligiert und zur Transformation von *E. coli* Top10 eingesetzt. Die erhaltenen Klone wurden durch Kolonie-PCR mit den Primern 5'PlantMRP-CRI + M13rev bzw. 5'PlantMRP-CRI + PUCuni auf Orientierung und Länge des Inserts getestet. Klone mit einem Insert von ca. 0,3 kbp wurden sequenziert. Dabei wurden Sequenzunterschiede identifiziert, die auf vier MRP-Varianten hindeuten (Abb. 77).

	10	20	30	40	50	60
TaMRP1-V1/2	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	AGCCACAGGATGAAGTGAGCGGGCCTAACAGCCCTGGA	60		
TaMRP2-V1/2	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	CAC TAGCCACAGGATGAAGTGAGCGGGCCTAACCAGCCCTGGA	60		
	70	80	90	100	110	120
TaMRP1-V1/2	AAGTCCCCGGGCCCCATGCGCAGCGATGCGCCACGGAGACGTGGACGGCCCCATGAGCCG	120			
TaMRP2-V1/2	AAGTCCCTGGGCCCCATGCGCAGCGATGCGCCACGGAGACGTGGACGGCCCCATGAGCCG	120			
	130	140	150	160	170	180
TaMRP1-V1/2	GCCCTCCCTGCGCTCGGCGGGGGGCTGAGACGAGTGTGGAGCCCTAATCACAGGGGGCCGG	180			
TaMRP2-V1/2	GCTCTCCCTGCGCTCGGCGGGGGGCTGAGACGAGTGTGGAGCCC-AATCACAGGGGGCCGG	179			
	190	200	210	220	230	240
TaMRP1-V1	CTCTGGGTCAATTGGCTAATCTCACAGTTATTCACCTTG-TTCCAAAT--GGATTAAACAG	236			
TaMRP1-V2	CTCTGGGTCAATTGGCTAATCTCACAGTTATTCACCTTGG-TCCGTATAATGGATTAAACAG	239			
TaMRP2-V1	CTCTGGGTCAATTGGCTAATCTCACAGTTATTCACCTTGG-TCCTAAT--TGGATTAAACAG	236			
TaMRP2-V2	CTCTGGGTCAATTGGCTAATCTCACAGTTATTCACCTTGG-TCCGTATAATGGATTAAACAG	238			
	250	260				
TaMRP1-V1/2	AACGGGGCTTACACTCCTGTGGCACCACC	265			
TaMRP2-V1/2	AACGGGGCTTACACTCCTGTGGCACCACC	267			

Abb. 77: Vergleich der Weizen MRP-Sequenzen

RACE und genomische Analyse ermittelten vier MRP RNA-Sequenzen aus *T. aestivum*. TaMRP1-V1/2: Variante 1 bzw. 2 der TaMRP1 in Bezug auf P19; TaMRP2-V1/2: Variante 1 bzw. 2 der TaMRP2 in Bezug auf P19.

Das 3'-Ende der TaMRPRs wurde aus EST-Sequenzen und durch Analyse der RNAs in Immunopräzipitaten (4.8.1) ermittelt. Eine durch Mfold errechnete Sekundärstruktur der beiden Varianten unterscheidet sich nur in der Ausbildung von P19 (Abb. 78). Auffällig ist die im Vergleich zu den MRPRs in *A. thaliana* kleine P3, die denen aus anderen *Poaceen* entspricht. Eine CRII kann nicht identifiziert werden.

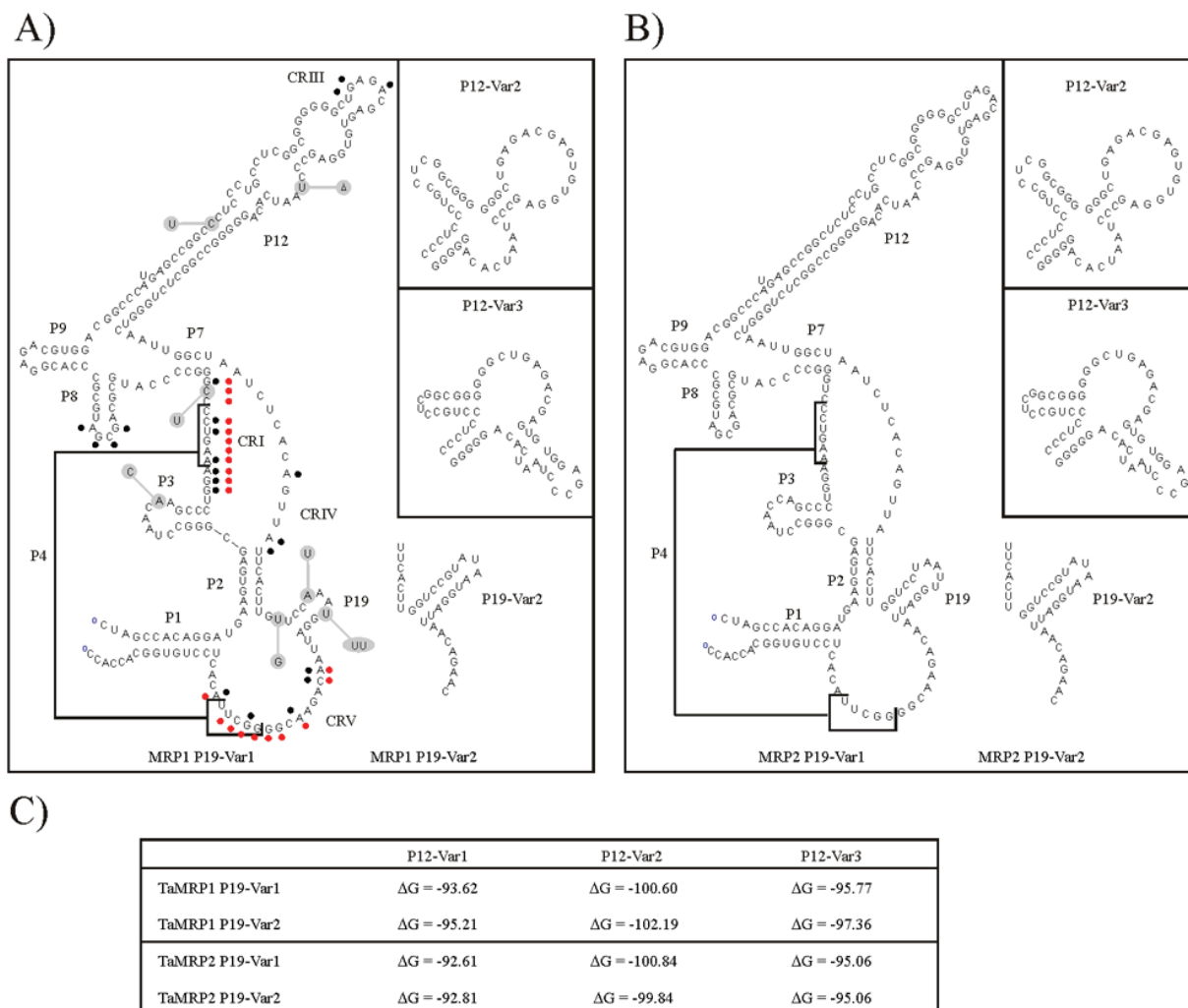


Abb. 78: Sekundärstruktur der identifizierten MRP RNA aus Weizen

A) TaMRP RNA 1; Grau markierte Basen außerhalb der Struktur zeigen die Sequenzunterschiede zur zweiten ermittelten MRP-Sequenz (B). Δ : die Base ist in der anderen Sequenz deletiert. •: konservierte Basen der RNase P RNAs nach Piccinelli et al., 2005 (CRI, CRV) und Marquez et al., 2005 (CRII-CRIV); •: konservierte Basen der RNase MRP RNAs nach Piccinelli et al., 2005 (CRI, CRV). B) TaMRP RNA 2; C) freie Enthalpie der verschiedenen Strukturen in kcal/mol. P12-Var1/2/3: Strukturvarianten der C-Domäne; P19-Var1/2: Struktur der Helix P19 der beiden Sequenzversionen der TaMRP1 und TaMRP2. CR: core region, konservierte Region

4.7.2 Nachweis der Weizen MRP RNA in gereinigter RNase P

Für den Nachweis der TaMRP RNA wurden die Nukleinsäuren aus einer chromatografisch gereinigten RNase P-Präparation (Arends und Schön, 1997) extrahiert (3.1.3) und mit DNase I behandelt. Nach der Reversen Transkription mit dem Primer 3'PlantMRP-CRV-antiT

wurde die cDNA mit dem Primerpaar 5'PlantMRP-CRI + WG-MRP1-anti amplifiziert (Abb. 79). Das PCR-Produkt von ca. 170 Bp wurde mit pCRII-TOPO ligiert. Nach Transformation von *E. coli* Top10 mit dem Ligationsansatz wurden die erhaltenen Klone durch Kolonie-PCR mit den Primern PUCuni + M13rev auf die Länge des Inserts getestet. Von den Klonen mit der erwarteten Länge von ca. 500 Bp (MCS und Insert) wurden die PCR-Produkte direkt sequenziert. In den gereinigten RNase P-Fractionen waren von acht sequenzierten Klonen drei Klone der Variante 1 und fünf Klone der Variante 2 (Abb. 77).

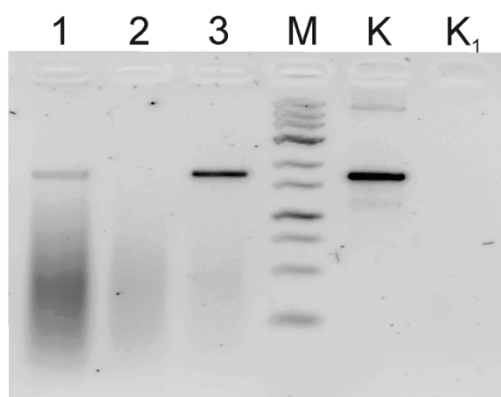


Abb. 79: Amplifikation von TaMRP-cDNA aus gereinigter RNase P

Durch PCR mit den Primern 5'PlantMRP-CRI + WG-MRP1-anti wurde aus TaMRP-cDNA ein 170 Bp-Fragment amplifiziert. Dieses wurde in einem 4 % GTG-Agarosegel aufgetrennt.

1: extrahierte RNA
2: DNase I behandelte RNA
3: cDNA aus DNase I behandelter Probe
M: Fermentas Low Range DNA Marker
K: genomische DNA aus Weizen
K1: Kontrolle ohne DNA

4.8 Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität aus S23-Weizenkeimextrakt

In früheren Experimenten (Heubeck, 2003) konnte durch Immunopräzipitation und anschließenden Aktivitätstests gezeigt werden, dass AtPOP1p mit RNase P-Aktivität aus Weizenkeimen assoziiert ist. Diese Vorarbeiten sollten als Grundlage für die Analyse der anderen identifizierten Proteine AtRpp29p, AtRpp38p, AtRpp30p und AtRpp14p dienen. Unter den beschriebenen Bedingungen war jedoch keine RNase P-Aktivität nachweisbar. Die hohen Salzkonzentrationen in den Bindungs- und Waschpuffern haben vermutlich den aktiven RNase P-Komplex zerstört. Daher wurde der Versuchsaufbau neu konzipiert. Für die Bindungs- und Waschpuffer wurden Pufferbedingungen verwendet, die für die Reinigung von Weizenkeim-RNase P beschrieben wurde (Arends, 1996; Arends und Schön, 1997). In Abb. 80 und Abb. 81 ist die Präzipitation mittels α AtPOP1p-, α AtRpp30p- bzw. α AtRpp38p Antikörper dargestellt. Hier wurden an Protein A-Sepharose gekoppelte IgG-Präparationen verwendet, die durch Behandlung mit Glycin von lose assoziierten Antikörpern befreit wurden. Die Kopplung der Antikörper erfolgte nach 3.7.11.1. Abweichend davon wurden 80 μ l α AtRpp38p- bzw. α AtRpp30p-Rohserum mit je 50 μ l Protein A-Sepharose (50 %, v/v) bzw. 100 μ l α AtPOP1p-Rohserum mit 100 μ l Protein A-Sepharose (50 %, v/v) inkubiert und anschließend chemisch gekoppelt. Für die Immunopräzipitation der RNase P-Aktivität wurde die IgG-gekoppelte Protein A-Sepharose mit 40 μ l vorbehandeltem S23 Weizenkeimextrakt

und 100 µl Puffer F2 (3.7.11.2) über Nacht unter Schütteln (400 Upm) inkubiert. Die anschließenden drei Waschschrte erfolgten mit Puffer F1 (3.7.11.2). Mit dem Immunopräzipitat wurde ein RNase P-Prozessierungstest durchgeführt (3.8.2). In den AtPOP1p-spezifischen und AtRpp30p-spezifischen Immunopräzipitaten kann RNase P-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 80, A). Die Kontrolle mit Protein A-Sepharose ohne gekoppelte Antikörper zeigt, dass die Säulenmatrix nicht mit RNase P- oder anderen RNase Aktivitäten kontaminiert ist (Abb. 80, B, Spur 1 und 2). Für die Substratkontrolle wurde pre-tRNA^{Tyr} ohne Extraktzugabe im Reaktionspuffer inkubiert.

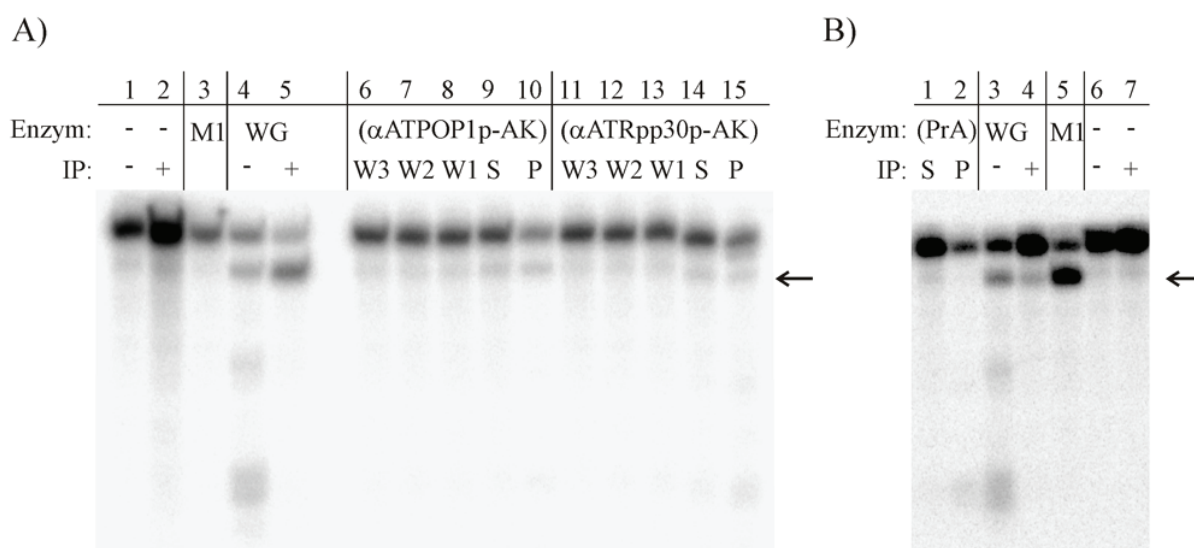


Abb. 80: Immunopräzipitation der RNase P-Aktivität aus Weizenkeimextrakt mit AtPOP1p- bzw. AtRpp30p-spezifischen Antikörpern

Pro Reaktion wurden 6,7 µg Protein entsprechender Weizenkeimextrakt (WG-S23) und 268 fmol radioaktiv markierte pre-tRNA^{Tyr} eingesetzt. Die Pfeile markieren die prozessierte tRNA^{Tyr}. W: Waschfraktionen der IPs; S: Überstand der IPs; P: Sediment der IPs.

A) 1: unbehandeltes Substrat (-); 2: in IP-Puffer inkubiertes Substrat ohne Extrakt (+; 402 fmol); 3: M1-RNA (5 ng); 4: WG-S23, unbehandelt (-); 5: WG-S23, vorbehandelt mit Protein A-Sepharose (+); 6-10: IP mit AtPOP1p-spezifischen Antikörpern; 11-15: IP mit AtRpp30p-spezifischen Antikörpern;

B) Kontrollreaktionen: 1: IgG-Protein A-Sepharose Überstand; 2: IgG-Protein A-Sepharose Sediment; 3: WG-S23, unbehandelt (-); 4: WGS23, vorbehandelt mit Protein A-Sepharose (+); 5: M1-RNA (15 ng); 6: unbehandeltes Substrat (-); 7: in IP-Puffer inkubiertes Substrat ohne Extrakt (+).

Die Immunopräzipitation mit AtRpp38p-spezifischen Antikörpern zeigt neben einer schwachen RNase P-Aktivität weitere Endonukleaseaktivitäten, die im Weizenkeimextrakt enthalten sind (Abb. 81). Eine unspezifische Bande kurz oberhalb des Produktes (reife tRNA) stammt vermutlich von einer säure/basenkatalysierten Spaltung an einer spezifischen Stelle in der tRNA, die besonders in Proben nach längerer Lagerung gehäuft auftritt. Da die abgespaltete 5'-Flanke sehr kurz ist, wurden die Gele so lange laufen gelassen bis die pre-tRNA und die reife tRNA voneinander getrennt waren und die Flanke aus dem Gel lief.

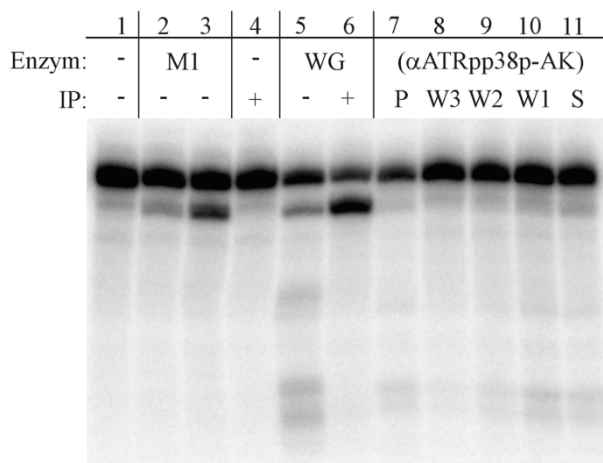


Abb. 81: Immunopräzipitation der RNase P-Aktivität aus Weizenkeimextrakt mit AtRpp38p-spezifischen Antikörpern

1: unbehandeltes Substrat; 2, 3: M1-RNA (10 ng bzw. 54 ng); 4: Substratinkubation ohne Extrakt; 5: WG-S23, unbehandelt; 6: WG-S23, mit Protein A-Sepharose vorbehandelt; 7: Sediment der IP; 8-10: Waschfraktionen der IP; 11: Überstand der IP. Der Pfeil markiert die prozessierte tRNA^{Tyr}. W: Waschfraktionen der IP; S: Überstand der IP; P: Sediment der IP.

4.8.1 Nachweis der Weizen RNase MRP RNA in RNase P-aktiven Immunopräzipitaten

Für den Nachweis der TaMRPR wurden die unter 4.8 beschriebenen AtPOP1p-spezifischen Immunopräzipitate, sowie gereinigte RNase P-Fractionen (Arends und Schön, 1997) mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert (3.1.3). Die enthaltenen Nukleinsäuren wurden nach DNase I-Verdau für eine Reverse Transkription mit dem Primer 3'PlantMRP-CRV-antiT verwendet. Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit den Primerpaaren 5'PlantMRP-CRI + 3'PlantMRP-CRV-antiT und 5'PlantMRP-CRI + WG-MRP1-anti (Abb. 82). Das PCR-Produkt von ca. 170 Bp Länge wurde mit pCRII-TOPO ligiert. Mit diesem Ligationsansatz wurden *E. coli* Top10 transformiert. Die transformierten Klone wurden durch Kolonie-PCR mit den Primern PUCuni + M13rev auf die Länge des Inserts getestet. Von den Klonen mit der erwarteten Länge von ca. 500 Bp (MCS und Insert) wurden die PCR-Produkte direkt sequenziert. In den Immunopräzipitaten war in den 7 sequenzierten Klonen nur die Variante 2 der TaMRP RNA (4.7.1) vorhanden.

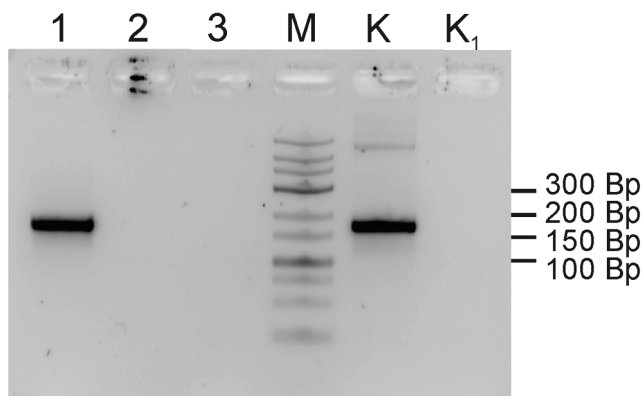


Abb. 82: Identifikation von Weizen-RNase MRP RNA in AtPOP1p-spezifischem Immunopräzipitat

In zwei aufeinanderfolgenden PCRs wurde aus MRP-cDNA ein 170 Bp-Fragment amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem 3 % GTG-Agarosegel aufgetrennt.

1: cDNA aus DNase I behandeltem IP
2: DNase I behandeltes IP (RNA-Kontrolle)
3: unbehandeltes IP (RNA-Kontrolle)
M: Fermentas Low Range DNA Marker
K: genomische DNA aus Weizen
K₁: Kontrolle ohne DNA

4.8.2 Analyse der RNA-Population in RNase P-aktiven Immunopräzipitaten

Nachdem eine Variante der MRP RNA in POP1-Immunopräzipitaten aus Weizen nachgewiesen wurde, sollte die RNA-Population in diesen Immunopräzipitaten auf die Anwesenheit möglicher Substrate bzw. Reaktionsprodukte von RNase P und MRP untersucht werden. Für den Nachweis unbekannter RNAs durch unspezifische RACE, wurden die RNAs aus den Enzympräparationen durch Phenolextraktion isoliert und anschließend mit DNase I behandelt, um kontaminierende DNAs zu entfernen. Die RNAs wurden am 3'-Ende polyadenyliert (3.4.4.1), mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) gereinigt und eine cDNA-Synthese mit dem Oligo(dT)Anker(V)-Primer durchgeführt. Nach Reinigung durch Microconsäulen wurde die cDNA am 3'-Ende polycytidylt (3.4.4.1). Die Synthese des Zweitstranges sowie die Amplifikation der cDNA wurde mit den Primern AnkerBRL und Anker2, die jeweils am Poly(A) bzw. am Poly(C) binden, durchgeführt. Die doppelsträngige cDNA wurde im 4 % GTG-Agarosegel fraktioniert und die Fragmente der verschiedenen Größen getrennt eluiert. Diese wurden mit pCRII-TOPO ligiert und sequenziert.

Neben der TaMRPR2 wurden verschiedene Fragmente mitochondrialer und nukleärer 18S, nukleärer 26S, 5,8S und 5S ribosomaler RNA sowie Fragmente der intergenischen Region zwischen 25S und 18S (IGS) identifiziert (Tab. 5). Eine Spezies der tRNA^{Asp} wurde ebenso im Immunopräzipitat nachgewiesen. Zusätzlich wurden aus den Immunopräzipitaten einige kurze RNA-Sequenzen amplifiziert, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

Tab. 5: Übersicht der identifizierten RNAs mit der Zahl zugehöriger Fragmente

Genabschnitt	Bereich	Accession	Klone
25S*	444-1027	AY049041	2
(25S)IGS(18S)#	310-487	X07841	10
18S*	(-)20-1737	AJ272181	13
5,8S*	1-163	FJ229967	9
5S*	1-120	AY316209	2
tRNA-Asp*,+	1-28	AB005781	1
MRP RNA Var.2	138-249	FN689353	4
mt18S	118-446	NC_001284	1
mRNAs/unbekannte RNA	-		6

* Angaben beziehen sich auf den jeweiligen Start der reifen RNA

Angaben beziehen sich auf die angegebene Sequenz mit der Accessionnummer: X07841

+ tRNA-Asp aus *A. thaliana*, da in Weizen keine solche tRNA annotiert wurde

5. Diskussion

Das ubiquitär vorkommende Magnesium-abhängige Enzym RNase P ist für die 5'-Reifung der pre-tRNAs verantwortlich. Die essentielle Endonuklease hydrolysiert die Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Flanke und tRNA-Domäne des tRNA-Primärtranskriptes (Altman und Smith, 1971; Robertson et al., 1972). Das bakterielle Holoenzym besteht aus einer Protein- und einer RNA-Untereinheit. In Archaea setzt sich das Enzym aus fünf Proteinen und einer RNA zusammen (Kawano et al., 2006; Pulukkunat und Gopalan, 2008). Die bisher gut untersuchten eukaryotischen Enzyme sind Komplexe aus bis zu zehn Proteinen und einer RNA. *In vitro* sind die RNAs aus allen drei Organismengruppen unter bestimmten Bedingungen in der Lage, als *trans*-agierendes Ribozym zu fungieren (Guerrier-Takada et al., 1983; Kikovska et al., 2007).

Im Gegensatz zu anderen Eukaryoten existieren nur wenige Informationen zum Aufbau von RNase P aus Pflanzen. Insbesondere konnte bisher keine RNase P-RNA identifiziert werden. Zielstellung dieser Arbeit ist es, die Zusammensetzung von RNase P sowie der verwandten RNase MRP in pflanzlichen Zellkernen aufzuklären. In dieser Arbeit sollten deshalb die bisher unbekannten Proteinuntereinheiten von RNase P bzw. RNase MRP aus dem pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* identifiziert und funktionell charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte nach einer möglichen RNA-Untereinheit der pflanzlichen RNase P gesucht sowie der Zusammenhang zwischen den in *A. thaliana* bekannten MRP RNAs und den beiden RNA-Enzymen RNase P und RNase MRP geklärt werden.

5.1 Die RNase MRP RNAs in *Arabidopsis thaliana*

Im *Arabidopsis thaliana*-Genom sind bisher zwei Gene für RNase MRP RNAs beschrieben worden (Kiss et al., 1992; Piccinelli et al., 2005); diese lokalisieren auf den Chromosomen 2 (MRPR2) und 3 (MRPR1). Dabei muss beachtet werden, dass für die Annotierung des RNA-Typs der eukaryotische RNase P- bzw. RNase MRP-Konsensus hauptsächlich aus Sequenzen von Vertebraten und Pilzen (überwiegend Hefen) erstellt wurde, die sich in den konservierten Regionen nur wenig unterscheiden. Auch spätere Annotierungen mit erweiterter Artenvielfalt kamen zu der gleichen Schlussfolgerung: CRI und CRV der MRP-Konsensussequenz nach Piccinelli et al. (2005) sind deutlich in den zwei MRPRs aus *A. thaliana* zu erkennen. Mit geringerer Übereinstimmung passen die Sequenzen aber auch in den RNase P-Konsensus derselben Autoren (Abb. 83). In dem Alignment wird deutlich, dass auch die für RNase P-RNAs typischen Sequenzmerkmale CRII, CRIII und CRIV in den MRPRs aus *A. thaliana* und anderen photosynthetischen Eukaryoten identifiziert werden können.

[illegible]

Abb. 83: Alignment der universal konservierten Regionen von RNase P-RNAs

Das Alignment enthält RNase P-RNA-Sequenzen aus fünf Eukaryoten (E), fünf Archaeen (A), elf Bakterien (Typ A: B-A, Typ B: B-B), sowie die P/MRP RNA-ähnlichen Sequenzen aus 21 Pflanzen (Pf). CRI etc.: konservierte Regionen in RNase P-RNAs (Chen und Pace, 1997; Marquez et al., 2005); CRI P etc.: konservierte

Regionen der RNase P-RNAs; CRI MP etc.: konservierte Regionen der RNase MRP RNAs (Piccinelli et al., 2005); Cons: Konsensussequenz der zu 85 % konservierten Basen eines Alignments von RNase P- und MRP RNA-Sequenzen aus 51 Eukaryoten, 41 Archaeen, 340 Typ A- und 34 Typ B-RNase P-RNAs aus Bakterien sowie 40 Pflanzen. Die Sequenzen von E, A, B-A und B-B stammen von der RNase P Database (Brown, 1999; <http://mbio.ncsu.edu/rnasep/alignments.html>). Die pflanzlichen Sequenzen wurden durch BLAST mit den in dieser Arbeit ermittelten Konsensussequenzen der CRI und CRV für Pflanzen ermittelt. See: *Saccharomyces cerevisiae*, Spo: *Saccharomyces pombe*, Hsa: *Homo sapiens*, Xla: *Xenopus laevis*, Osp: *Onchornhynchus sp.*, Sso: *Sulfolobus solfataricus*, Pho: *Pyrococcus horikoshii*, Pfu: *Pyrococcus furiosus*, Mth: *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, Afu: *Archaeoglobus fulgidus*, Eco: *Escherischia coli*, Ppu: *Pseudomonas putida*, Asp: *Anabaena sp.* PCC7120, Psp: *Pseudoanabaena sp.* PCC6903, Pma: *Prochlorococcus marinus*, Ssp: *Synechocystis sp.* PCC6803, Bst: *Bacillus stearothermophilus*, Bsu: *Bacillus subtilis*, Smu: *Streptococcus mutans*, Uur: *Ureaplasma urealyticum*, Mpn: *Mycoplasma pneumoniae*, Pcr: *Porphyridium cruentum*, Olu: *Ostreococcus lucimarinus*, Aly: *Arabidopsis lyrata*, Ath: *Arabidopsis thaliana*, Bst: *Boechera stricta*, Bna: *Brassica napus*, Bra: *Brassica rapa*, Tae: *Triticum aestivum*, Gma: *Glycine max*, Mtr: *Medicago truncatula*, Vra: *Vigna radiata*, Bdi: *Brachypodium distachyon*, Hvu: *Hordeum vulgare*, Sbi: *Sorghum bicolor*, Osa: *Oryza sativa*, Zma: *Zea mays*, Hlu: *Humulus lupulus*, Nta: *Nicotiana tabacum*, Sly: *Solanum lycopersicum*, Stu: *Solanum tuberosum*, Vvi: *Vitis vinifera*.

In den RNA-Sequenzen der einzelligen Algen *Volvox carteri*, *Micromonas sp.* RCC299, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella variabilis*, *Cyanidioschyzon merolae* und *Ostreococcus tauri* können CRII und CRIII nicht eindeutig identifiziert werden, dagegen aber in *Porphyridium cruentum* und *Ostreococcus lucimarinus*. Da in den meisten dieser Organismen zwei sehr ähnliche Sequenzen identifiziert werden können, spricht das für die Theorie eines gemeinsamen Vorläufer-Gens, aus dem beide RNAs hervorgegangen sind (Woodhams et al., 2007).

Um die beiden RNAs aus *A. thaliana* für funktionelle und strukturelle Studien verwenden zu können, wurden ihre 5'-Enden analysiert und der Transkriptionsstart sowie das 5'-Ende der reifen RNA ermittelt. Dabei konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass AtMRPR2 ähnlich wie auch die RNase P-RNAs in *S. cerevisiae* und *S. pombe* mit der Promotorsequenz zusammen transkribiert wird (Krupp et al., 1986; Lee et al., 1991a; Srisawat et al., 2002). Für die RNase P-RNA in *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Holoenzymkomplexe mit der längeren RNA Variante zwar eine vergleichbare RNase P-Aktivität besitzen, die Zusammensetzung des Holoenzym aber geändert ist (Srisawat et al. 2002; Hsieh et al., 2009). Die prozessierte AtMRPR2 konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die Bestimmung des 5'-Endes der AtMRPR1 zeigte einen Transkriptionsstartpunkt, der dem von Kiss et al. (1992) beschriebenen leicht abweicht und zwei Nukleotide weiter *upstream* liegt; dieser Unterschied lässt sich jedoch mit den unterschiedlichen Analysenmethoden erklären. Anders als AtMRPR2 wird AtMRPR1 ohne die Promotorregion transkribiert (Abb. 24Abb. 20), oder aber bereits während der Transkription effizient prozessiert. Für den Fall, dass AtMRPR1 und AtMRPR2 trotz dieses Unterschiedes die gleiche Funktion ausüben, könnte das Mengenverhältnis der beiden zueinander auf einen Regulationsmechanismus hinweisen.

Puranam und Attardi (2000) bestimmten in HeLa-Zellen etwa die doppelte Menge an RPR im Vergleich zu MRPR (54400 H1-RNA- und 30000 7-2-RNA-Moleküle). Ein ähnliches Verhältnis konnte in dieser Arbeit durch semiquantitative RT-PCR für die beiden MRP RNAs in *A. thaliana* ermittelt werden ($\text{AtMRPR1}:\text{AtMRPR2} \approx 4:1$). Die alternative Methode des Northern Blot benötigt für eine Quantifizierung von kleinen RNAs relativ viel Startmaterial (10 - 20 µg Gesamt-RNA oder 5 - 10 µg fraktionierte RNA) und erlaubt nur grobe Abschätzungen der Mengenverhältnisse. Eine Aussage über Expression und Mengenverhältnisse der beiden RNAs in *A. thaliana* könnte auch durch *real time*-PCR in verschiedenen Geweben (z.B. Keimblätter, Blatt, Wurzel, Internode) und während der Entwicklung (Keimung, Sprossung) erhalten werden. Allerdings ist durch die große Sequenzähnlichkeit eine Parallelanalyse der beiden RNAs mit dieser Methode nicht möglich. Dieser Nachteil wurde durch die Sekundäranalyse der RT-PCR Produkte mit EcoRV-Hydrolyse und gelelektrophoretischer Analyse behoben.

Um spezifische Strukturelemente pflanzlicher RNase MRP RNAs zu identifizieren, wurden anhand der wenigen bekannten MRPR-Sequenzen aus *A. thaliana* und anderen Pflanzen "universale" Primer konstruiert, mit denen die *Core*-Sequenzen von je zwei RNase MRP RNA Varianten in *V. radiata* und *N. tabacum*, und jeweils eine Sequenz in *B. rapa* und *T. aestivum* aus genomischer DNA isoliert. Zusätzlich konnten sowohl 3'- und 5'-Ende der RNase MRP RNA aus *T. aestivum* ermittelt werden. Durch den Vergleich dieser Sequenzen konnte ein neues strukturelles Merkmal in der P3-Domäne der Brassicaceen identifiziert werden. Dort wird die Ausbuchtung durch die einzelsträngige Sequenz AUAU in AtMRPR1 (ACAU in AtMRPR2) stromaufwärts des P3-Loops und nicht wie in früheren Strukturvorschlägen (Kiss et al., 1992; Piccinelli et al., 2005) durch UCC stromabwärts des P3-Loops ausgebildet. Dieses Strukturelement (Marquez et al., 2005) ist zwar in *A. thaliana* thermodynamisch instabiler, wird aber in anderen Brassicaceen energetisch bevorzugt. Die Ausbildung der Helix P5/7 wurde aufgrund des Alignments mit diesen und anderen pflanzlichen RNase MRP-Sequenzen bestätigt. Auffällig ist auch, dass die identifizierten pflanzlichen RNase MRP RNAs im Vergleich mit anderen zu den kurzen RNAs zu zählen sind und somit eine Minimalsequenz bzw. -struktur darstellen könnten. Die Gesamtstruktur der beiden RNAs aus *A. thaliana* zeigt die Merkmale des RNase MRP-Typs (Abb. 76, S. 157). Aus der Abbildung wird deutlich, wie sich die wenigen Sequenzunterschiede in der Sekundärstruktur auswirken. In der P12-Domäne beider RNAs werden mehrere Loops ausgebildet, wodurch diese strukturell flexibler wird. Da die Struktur der P12 besonders in MRP RNAs wenig konserviert ist, ist unklar, ob die berechnete Struktur der tatsächlichen entspricht. Die in Abb. 77 dargestellte Struktur ist nicht die energetisch günstigste, wurde aber

unter Berücksichtigung der Sequenzen der zu *A. thaliana* eng verwandten *B. rapa*, *B. napus*, *B. oleracea* und *B. stricta* erstellt. Eine alternative, energetisch ungünstigere Struktur der P12 wird in Abb. 84 dargestellt. Diese Strukturen können unter der Vorgabe der in RNase P-RNAs konservierten CRII und CRIII als einzelsträngige Region berechnet werden. Dabei führen die wenigen Sequenzunterschiede der beiden Sequenzen zu sehr unterschiedlichen P12-Sekundärstrukturen. Die Ausbildung einer eP15-Helix in MRP2 ist ein typisches RNase P- und RNase MRP RNA-Strukturelement, das in MRPR1 nicht vorhanden ist. Die Insertionen führen zu einer Verlängerung der P19-Helix.

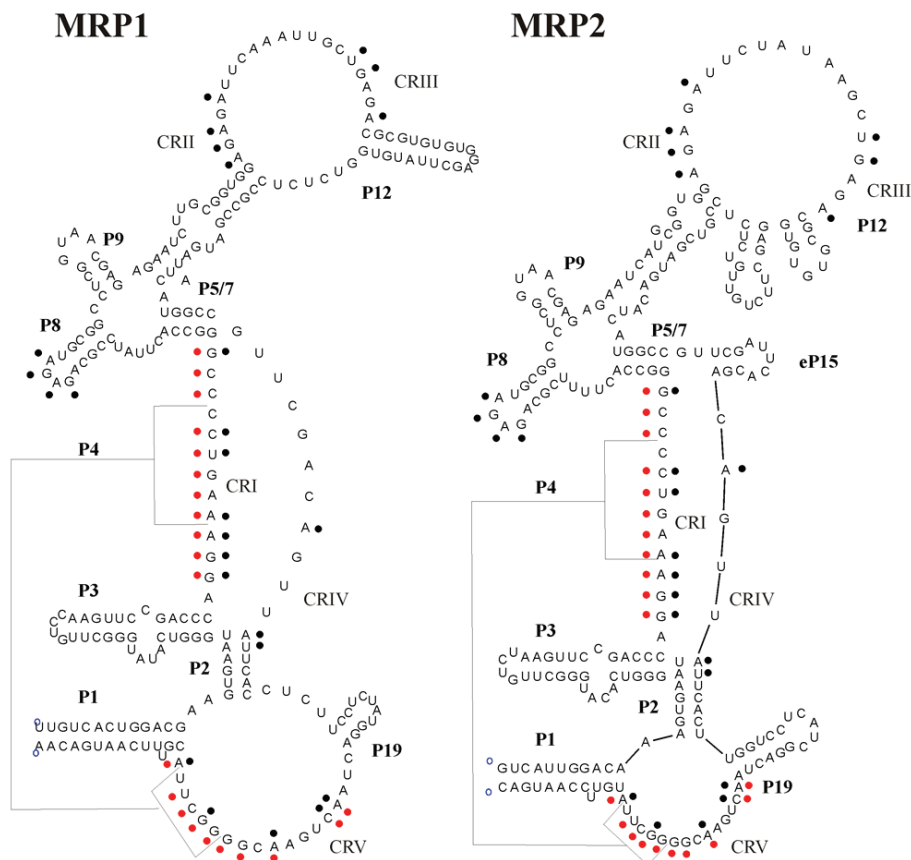


Abb. 84: Struktur der *A. thaliana* RNase MRP RNAs

MRPR1 und MRPR2 unterscheiden sich in Sequenz und Struktur (z.B. P12, eP15, P19). Die in RNase P konservierten Nukleotide, die in diesen beiden RNAs vorkommen, wurden mit schwarzen Punkten markiert. Der MRP-Konsensus wird durch rote Punkte neben den Basen markiert. MRPR1: $\Delta G = -56,34$ kcal/mol; MRPR2: $\Delta G = -55,74$ kcal/mol.

Um funktionelle Studien durchführen zu können, wurden neben den Transkriptionsklonen der beiden vollständigen MRP RNAs aus *A. thaliana* zusätzlich verkürzte Varianten der MRPR1 konstruiert. Hier zeigte vor allem die S-Domäne der MRPR1 die Tendenz zur Bildung von Multimeren. Dies kann auf die hohe Komplementarität innerhalb dieser Strukturdomäne zurückgeführt werden, jedoch auch aus der Aufgabe dieser Domäne zur Substratbindung bzw.

zur RNA-Bindung resultieren. Da für bakterielle RNase P-RNAs gezeigt wurde, dass diese als Dimer im Holoenzym vorkommen (Fang et al., 2001), könnte in dem Fall, dass eukaryotische RNase P- oder MRP RNAs ebenfalls als Dimer vorkommen, die S-Domäne für die Dimerisierung verantwortlich sein. Für Interaktionsstudien mit den RNase P/MRP Proteinen wurde außerdem ein Transkriptionsklon der isolierten P3-Domäne kloniert, da diese in RNase P aus Mensch und Hefe für die Proteinbindung und damit dem Aufbau des Holoenzymkomplexes essentiell ist, sowie zur pre-tRNA- und RNase P-RNA-Reifung beiträgt (Lee et al., 1996; Ziehler et al., 2001; Perederina et al., 2007).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den als MRPRs identifizierten RNAs aus *A. thaliana* und dem RNase P-Komplex nachzuweisen, wurden die Interaktionen zwischen diesen RNAs und den RNase P/MRP Proteinen sowie einer pre-tRNA untersucht. Beide MRPR-Varianten (AtMRPR1 und AtMRPR2) können von den RNase P/MRP Proteinen AtPOP1p, AtRpp38p, AtRpp30p und AtRpp14p gebunden werden (Abb. 53, Abb. 62, Abb. 65, Abb. 64). In diesen Versuchen wurde ein MRPR2 Transkript ohne den transkribierten 5'-Bereich verwendet. Ob diese flankierende Sequenz, die den Promotor enthält, einen Einfluss auf die Komplexbildung mit den Proteinen hat, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht; die Anwesenheit der Flanke könnte zu einer Änderung der Bindungsstärke oder Spezifität im Komplex führen. Da in dieser Arbeit keine prozessierte MRPR2 in *A. thaliana* nachgewiesen werden konnte, ist diese Flanke möglicherweise ein molekulares Erkennungsmerkmal für die Proteine im Komplex, um die Funktion oder Zusammensetzung *in vivo* zu modulieren. Eine Bindung der MRP RNAs an das RNase P-Substrat pre-tRNA^{Tyr} aus *N. tabacum* konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass diese RNAs nicht an der Prozessierung von tRNAs beteiligt sind. Da die Bindung von RNase P-RNAs an pre-tRNAs nicht sehr stabil ist, ist die native Gelelektrophorese möglicherweise nicht geeignet, um die Bindung zwischen den beiden RNAs zu analysieren. Perreault und Altman (1993) zeigten, dass die Bindungskonstante von bakterieller RNase P-RNA an ein Modellsubstrat (p6AT-1, 36 Nt) mit $k_s = 2,6 \mu\text{M}$ eine schwache Bindung charakterisiert. Die Größenordnung der Bindungskonstante eukaryotischer RNase P-RNA und pre-tRNA stimmt mit der bakteriellen überein ($\sim 0,8 \mu\text{M}$; Kikovska et al., 2007). Um die Bindung gelelektrophoretisch analysieren zu können, müssten die MRPRs während der Komplexbildung mit dem Substrat über reaktive Gruppen vernetzt werden. Die gebildeten Komplexe könnten anschließend von den freien RNAs im Gel oder durch Chromatografie abgetrennt und analysiert werden (Marquez et al., 2006).

5.2 RNase P/MRP RNA in Weizenkeimen

In dieser Arbeit wurden aufgrund von Sequenzvergleichen verschiedener pflanzlicher RNase MRP RNA-Sequenzen Primerpaare erstellt, die die am höchsten konservierten Sequenzregionen CRI und CRV in diesen RNAs erkennen. Um auch im biochemisch funktionellen Modellsystem, dem Weizenkeim-Extrakt, eine mögliche RNase P/MRP RNA identifizieren zu können, wurde mit den Primern 5'-Plant-MRP-CRI und 3'-Plant-MRP-CRVanti-W aus genomischer DNA sowie durch RT-PCR von Gesamt-RNA aus Weizenkeimen eine 195 Bp lange Core-Sequenz amplifiziert, die die Bereiche CRI bis CRV enthält. Die Sequenzbereiche P1-P3 wurden durch RACE bestimmt. Sowohl durch genomische PCR, als auch bei der RNA-Analyse wurden zwei sehr ähnliche RNA-Sequenzen identifiziert, die als Variante 1 und 2 bezeichnet werden. Die 3'-Termini dieser RNAs wurden durch ESTs aus Weizen bestätigt und vervollständigt (Mochida et al., 2006). Die Sequenzen zeigen große Übereinstimmung mit den MRPRs aus *A. thaliana* sowie *O. sativa* (Piccinelli et al., 2005) und lassen sich wie diese in der Struktur des RNase MRP-Typs darstellen. Durch einen Northern Blot in dieser Arbeit wurde erstmals in Weizen eine RNase MRP-Variante nachgewiesen, deren Länge den MRPRs aus *A. thaliana* entspricht (Abb. 23). Im selben Experiment wurde außerdem eine größere RNA detektiert. Diese könnte eine unprozessierte Variante der RNA oder eine noch nicht identifizierte Spezies darstellen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzinformationen wurden für die Identifikation von MRP RNAs in POP1-spezifischen Immunopräzipitaten und in gereinigter RNase P aus Weizenkeimen durch RT-PCR verwendet. Dabei konnten beide Varianten der RNase MRP RNA in der gereinigten RNase P-Fraktion und die Variante 2 in den Immunopräzipitaten nachgewiesen werden.

5.3 Gibt es eine RNase P-RNA in Pflanzen?

Aufgrund der Eigenschaften von RNase P aus Weizen (Schön, 1996; Arends und Schön, 1997) und Karotten (Franklin et al., 1995) wurde die Hypothese einer nukleären RNase P-RNA in Pflanzen aufgestellt. Die in dieser Arbeit identifizierten RNase P/MRP Proteine zeigen eine starke Verwandtschaft zu den nukleären RNase P-Untereinheiten aus Hefe, Mensch und anderen untersuchten Eukaryoten. Es besteht somit eine große Wahrscheinlichkeit, dass in Pflanzen eine ähnliche Zusammensetzung des Holoenzym mit einer RNA-Untereinheit vorliegt.

Die hohe Sequenzidentität zwischen den beiden MRP RNAs aus *A. thaliana* (87,4 %) spricht nicht gegen eine RNase P-Identität einer der RNAs. Unterstützt wird diese Vermutung durch die teilweise völlige Übereinstimmung in Teilbereichen der Helices (z.B. P1, P2, P8, eP9, P10/11) der RNase P- und MRP RNAs anderer Organismen (Zhu et al., 2006). Beide MRP RNAs aus *A. thaliana* enthalten die in RNase P RNAs hochkonservierten Basen (Abb. 84). Möglicherweise stellen pflanzliche RNase P- und MRP RNAs ein Relikt der Genduplikation dar, durch das die beiden Spezies aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind (Li et al., 2002). Dagegen sprechen die nur mäßigen Gesamtidentitäten zwischen den RNase P- und RNase MRP RNAs in den meisten Organismen (*S. cerevisiae* 38 %; *D. discoideum* 45,6 %; *D. melanogaster* 34 %; *H. sapiens* 34,1 %; *E. cuniculi* 34,5 %; *G. zeae* 40,4 %, *T. gondii* 44,6 %; Piccinelli et al., 2005; Zhu et al., 2006), wobei in niederen Organismen die Identitäten höher sind. Da in Pflanzen bisher keine Sequenzen von RNase P-RNA, jedoch in vielen Pflanzen zwei verschiedene MRPR-Spezies zum Teil mit unterschiedlicher Struktur (P12, eP15) bekannt sind (Kiss et al., 1992; Piccinelli et al., 2005; Ergebnisse dieser Arbeit), muss angenommen werden, dass RNase P in pflanzlichen Zellkernen entweder ohne RNA-Untereinheit auskommt oder dass eine der beiden annotierten MRP RNAs der RNase P-RNA entspricht. Eine RNase P ohne RNA-Untereinheit wäre nicht ungewöhnlich, da auch RNase P in Mitochondrien menschlicher Zellen, sowie in Chloroplasten und Mitochondrien höherer Pflanzen, ein reines Protein-Enzym ist (Gegenheimer, 1996; Holzmann et al., 2008; Gobert et al., 2010). Zu diesem pflanzlichen RNase P Protein aus Chloroplasten und Mitochondrien existieren orthologe Proteine, die in den Nuklei lokalisieren. Deren Aktivität konnte aber noch nicht bestimmt werden.

Die Tatsache, dass mit Antikörpern gegen RNase P/MRP Proteine die RNase P-Aktivität präzipitiert werden kann, bestätigt auf Proteinebene die große Ähnlichkeit des pflanzlichen Enzymkomplexes zu denen aus anderen Eukaryoten. Die Anwesenheit von MRP RNA in Immunopräzipitaten aus Weizenkeimextrakt sowie in hochreinen Enzymfraktionen mit RNase P-Aktivität zeigt, dass RNase P-Aktivität und MRP RNAs in einem Komplex assoziiert sind. Die Mehrheit der nachgewiesenen RNAs in den Immunopräzipitaten waren 18S und 5,8S RNAs, Substrate der RNase MRP. Ob die MRP RNAs in diesen Komplexen eine Funktion bei der pre-tRNA/pre-rRNA-Prozessierung übernehmen, wurde in dieser Arbeit nicht gezeigt. Da eine Ribozymaktivität der MRP RNAs *in vitro* nicht eindeutig nachgewiesen wurde, könnte die RNase P-Aktivität der Immunopräzipitate auf anderen noch nicht identifizierten Komponenten basieren, die mit AtPOP1p interagieren. Alternativ wäre vorstellbar, dass eine oder beide RNAs in einem gemeinsamen Ribonukleoproteinkomplex existieren und beide Funktionen ausüben können. Die Frage, ob eine nukleäre RNase P-RNA

in Pflanzen mit derselben Proteinzusammensetzung wie in Hefen oder Säugern als Komplex existiert, lässt sich mit dem bisherigen Wissensstand und im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend beantworten.

5.4 Klonierung der RNase P/MRP Proteine und Analyse der Expression in vivo

5.4.1 Genstruktur und Expression von AtPOP1

In Mensch und Hefe wird POP1 als ein ca. 100 kDa großes Protein exprimiert und ist zentraler Bestandteil des RNase P- und des RNase MRP-Komplexes. Es bindet sowohl die RNase P- als auch die RNase MRP RNA und ist auch an deren Reifung beteiligt (Lygerou et al., 1994; Ziehler et al., 2001; Welting et al., 2004). Die Analyse von POP1-mRNAs in verschiedenen Datenbanken führte zu keinem eindeutigen Ergebnis für ein POP1-Homologes in *A. thaliana*, da sich die annotierten Sequenzen in den Spleißmustern unterscheiden. Die 5'-Enden der bekannten ESTs beginnen 39-263 Nt vor dem Translationsstart. Die Bestimmung des Transkriptionsstarts dieser mRNA erforderte daher eine experimentelle Bestätigung. Die Analyse der Gensequenz definiert eine 480 Bp lange Sequenz vor dem Translationsstart als Promotorregion, der Promotor wird jedoch nicht als TATA-Promotor identifiziert. Für die Promotorregion können nur wenige Bindungsstellen für bekannte Transkriptionsfaktoren ermittelt werden (PlantProm: Shahmuradov et al., 2003; Athena: O'Connor et al., 2005; Agris: Palaniswamy et al., 2006). Darunter wurden zwei Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors GATA lokalisiert. GATA-abhängige Promotorelemente sind Bestandteil der licht-induzierbaren Transkriptionsregulation (Teakle et al., 2002). Die weitere Analyse der Gensequenz durch FGENESH (*softberry*) bestimmt den Transkriptionsstart 267 Bp vor dem Translationsstart. Die Annotierungen der kodierenden Region in den Datenbanken von TIGR und NCBI geben eine kodierende Sequenz von 2478 Nt für ein 826 AS und ein 659 AS langes Protein an (DQ069804.1, NP_001078072; DQ069805.1, NP_001078073). Die ursprüngliche Annotation in TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) bestimmte eine cDNA-Länge von 570 Bp, mit einem Protein aus 190 AS (AAB63829; Abb. 26, S. 108).

Die in dieser Arbeit durch RACE ermittelte neue AtPOP1 mRNA-Sequenz (FN673552) enthält einen 921 Nt langen kodierenden Bereich. Die Bestimmung des Transkriptionsstarts der POP1-mRNA durch 5'-RACE zeigte, dass die Transkription 273 Nt vor dem AUG beginnt. Durch die Wahl der Primer konnte anhand der enthaltenen Spleißstelle ausgeschlossen werden, dass die Sequenz aus der genomischen DNA amplifiziert wurde. Das in dieser Arbeit identifizierte Stopcodon und die Polyadenylierungsstelle befinden sich im

durch NCBI und FGENESH annotierten vierten Intron und wurden zuvor durch computerbasierte und experimentelle Methoden nicht erkannt. Pflanzliche Polyadenylierungssignale setzen sich aus drei Elementen zusammen: FUE (*far upstream element*), NUE (*near upstream element*) und CS (*cleavage site*). Das FUE ist ein Kontrollelement, das sich aus mehreren UG-Motiven unter Beteiligung der UGUAA-Sequenz zusammensetzt. Es ist 25-160 Nt stromaufwärts der CS lokalisiert und umfasst bis zu 100 Nt (Loke et al., 2005). Das NUE ist eine adeninreiche Sequenz von 6-10 Basen Länge und ist ca. 13-30 Basen stromaufwärts der CS lokalisiert (Li und Hunt, 1995). Die Spaltstelle selbst ist meist durch das Y₂/A₁-Dinukleotid (CA oder UA, 80 % konserviert) charakterisiert, das in einer U-reichen Sequenz eingebettet ist (Rothnie, 1996; Li und Hunt, 1997; Rothnie et al., 2001). Alle diese Merkmale sind in dieser neu identifizierten Spleißvariante vertreten.

Neben dem beschriebenen Transkript wurden im RACE zahlreiche am 5'-Ende verkürzte POP1-Transkripte erhalten, die vermutlich Produkte des cytoplasmatischen mRNA-Abbaus darstellen. Im Northern Blot konnten zwei mRNA-Populationen detektiert werden (Abb. 29, S. 111). Die kürzere Variante von etwa 1,2 kB wurde mit den Oligonukleotid-Sonden für Intron IIa sowie Intron IIb nachgewiesen und bestätigt die von Heubeck (2003) identifizierte mRNA-Länge von ca. 1000 Nt. Die längere mRNA mit 3,0 kB konnte nur mit der Sonde für Intron IIa detektiert werden. Durch Western Blot wurde gezeigt, dass *in vivo* zwei Proteine von etwa 34 kDa und 92 kDa existieren, die von POP1p-spezifischen Antikörpern erkannt werden; sie werden vermutlich von den beschriebenen mRNA Varianten translatiert (AtPOP1 Var 2a und Var 3, Abb. 26, S. 108, Abb. 70, Abb. 71). Im Weizenkeimextrakt wurde je ein starkes Signal bei ca. 35 und 90 kDa erhalten. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass POP1-Homologe in Pflanzen neben dem 90 kDa Protein auch als kleinere Proteine von ca. 35 kDa exprimiert werden. Die schwachen Signale der detektierten Proteine lassen vermuten, dass die Proteine in sehr geringer Anzahl im Proteom ausdifferenzierter Gewebe vorkommen. Das starke Signal des Proteins im undifferenzierten Weizenkeimextrakt bestärkt diese Vermutung. Eine Untersuchung von Extrakten weiterer nicht- bzw. teildifferenzierter Gewebe (z.B. Apikalzellen, Samen vor und während der Keimung) aus *A. thaliana* könnte diese Frage klären. Die Translation des postulierten 73,7 kDa Proteins beginnend von AUG2 in mRNA 2b mit alternativ gespleißtem Intron IIb kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da dieses die als Antigen verwendete POP1-Domäne nicht enthält.

5.4.2 Funktion von AtPOP1p

Die Analyse der Primärsequenz von POP1p-Homologen zeigt die vier hoch konservierten Regionen COR I-IV (Tab. 4, Seite 112; Xiao et al. 2006). COR I enthält eine Reihe von Argininen, COR II ist reich an Tryptophan und basischen Aminosäuren. Dieser Bereich (COR I und COR II) wird im Allgemeinen als POP1-Domäne bezeichnet und ist für die RNA-Bindung essentiell. Die beiden anderen Domänen sind COR III (POP1-like domain; POPLD) mit isolierten, stark konservierten Aminosäuren, sowie die an Glycin reiche COR IV. Einige Sequenzelemente in POP1p aus *S. cerevisiae* beeinflussen sowohl RNase MRP- als auch RNase P Funktionen gleichermaßen oder diskriminiert (Xiao et al., 2006). Einzelne Aminosäuren im C-terminalen Teil (COR III) sind in Hefe essentiell für den Organismus, auch wenn die pre-tRNA-Prozessierung nicht beeinflusst wird. Für andere Aminosäuren in COR III wurde gezeigt, dass sie für die RPR Reifung wichtig sind. Die Funktion der COR IV-Domäne ist bisher noch unklar.

Die in dieser Arbeit experimentell ermittelte Sequenz der neuen AtPOP1p-Variante (307 AS) enthält die beiden als POP1-Domäne bezeichneten hochkonservierten Regionen COR I und II, es fehlen aber COR III und COR IV (Tab. 4). Da die von Xiao et al. (2005a) identifizierten Sequenzen von AtPOP1p mit 826 AS bzw. 659 AS, nicht aber die kurze AtPOP1p-Sequenz von 307 AS, diese beiden Domänen enthalten, ist der C-terminale Teil möglicherweise für zusätzliche noch unbekannte Funktionen bedeutend. Beispielsweise wurden für das humane Rpp21p zwei Isoformen identifiziert von denen nur eines mit dem RNase P-Komplex interagiert und zur Bindung von pre-tRNA fähig ist. Das differentielle Spleißen wirkt sich ebenso auf Expressionsniveau und Lokalisierung aus (Jarrous et al., 2001). Nur das RNase P spezifische Rpp21p lokalisiert im Nukleoplasma und wird stärker exprimiert. Die andere Isoform akkumuliert in den Nukleoli.

Das RNase P-RNA Primärtranskript (Pre-RPR1) wird in Hefe in einen Komplex mit sieben Proteinen, darunter POP1p, integriert, bevor es zur reifen RNA prozessiert wird (Srisawat et al., 2002). Xiao et al. (2006) konnten in POP1p aus Hefe durch Aminosäuremutationen an Positionen in COR II (242, 243, 245, 249, 267, 274), COR III (626, 628, 631, 632, 634, 637) und in COR IV (823, 838, 839) deren Einfluss auf die Reifung der RNase P-RNA zeigen. Die Ansammlung von Vorläufermolekülen der RPR ist daher auch ein Anzeichen des fehlerhaften Zusammenbaus des Holoenzym und bewirkt eine geringere RNase P-Aktivität. Bis auf die Aminosäuren W₂₄₅, R₆₂₆, P₆₂₈, N₆₃₄ und K₆₃₇ beeinflussen Mutationen an den oben genannten Positionen auch die Menge der MRP RNA in der Zelle und spielen damit eine Rolle beim RNase MRP-Zusammenbau. Damit bieten die letztgenannten Aminosäuren einen

Anhaltspunkt in der Unterscheidung von RNase P- bzw. MRP Funktionen von POP1p. Diese sind in AtPOP1p mit W₁₂₉, R₅₅₈, P₅₆₀ (für W₂₄₅, R₆₂₆, P₆₂₈ in Hefe) nur teilweise repräsentiert. Für N₆₃₄ und K₆₃₇ gibt es keine Übereinstimmung, auch nicht in anderen pflanzlichen Homologen.

Mutationen an den Positionen R₉₈ (COR I), R₂₃₃ (COR II), G₈₃₄ und G₈₃₆ (COR IV) in POP1p aus Hefe beeinflussen die pre-tRNA-Prozessierung und übernehmen vermutlich eine Funktion bei der Substraterkennung, Katalyse oder Lokalisierung des Enzyms (Xiao et al., 2006). In *A. thaliana* und anderen Pflanzen ist nur die Aminosäure in COR I konserviert. Die in Hefe identifizierten Aminosäuren T₂₄₂, H₂₄₃, R₂₄₉ (COR II), die für die RPR-Bindung wichtig sind, sind auch in AtPOP1p (T₁₂₆, H₁₂₇, R₁₃₃) vorhanden (**Abb. 87**, S. 233). Für die Bindung an MRP RNA in Hefe sind die Aminosäuren F₈₉ und Q₉₀ (COR I) notwendig. F₈₉ wird in AtPOP1p durch F₅₂ repräsentiert. Die Aminosäure Q₉₀ ist in Eukaryoten zu 75 % konserviert und wird in AtPOP1p und anderen Pflanzen durch Arginin ersetzt. Die Übereinstimmung der RACE-Sequenzen mit der genomischen Sequenz schließt ein Editing der mRNA an dieser Stelle aus, durch das eine (G→A)-Modifizierung ein Arginincodon in ein Glutaminocodon editieren würde. Ob eine Mutation dieser beiden Aminosäuren in AtPOP1p die Bindung an eine der beiden MRPRs beeinflusst, könnte also Aufschluss über die Identität und Funktion der beiden RNAs (MRPR1 und MRPR2) als RNase P- oder MRP RNA geben.

Die Domänen COR III (Positionen 553-662 in *Sce*) und COR IV (821-868 in *Sce*) sind in der neuen, verkürzten AtPOP1p-Sequenz (307 AS) nicht vorhanden. Die lange AtPOP1p-Sequenz mit 826 Aminosäuren (Xiao et al., 2005a), sowie annotierte Proteinsequenzen von POP1-Homologen aus *O. sativa* (943 AS; EAY81818) und *V. vinifera* (806 AS; CAO69765) können aber mit der vollständigen Sequenz von POP1p aus *S. cerevisiae* verglichen werden. In diesen pflanzlichen Proteinen können zahlreiche konservierte Aminosäuren identifiziert werden, die Domäne COR III ist gut konserviert. Die Glycin-reiche COR IV ist in den pflanzlichen Sequenzen nicht eindeutig erkennbar. Somit könnte die COR IV ein spezifisches Merkmal von nichtpflanzlichen POP1-Homologen wie z.B. in Hefe und Mensch sein.

Die für RNase P Funktionen notwendigen Aminosäuren sind in Pflanzen schlecht konserviert. Einige Aminosäuren für die RPR Reifung und pre-tRNA Prozessierung sind in AtPOP1p nicht zu identifizieren. Lediglich die für die Bindung von RNase P und MRP RNAs wichtigen Aminosäuren sind eindeutig vorhanden. Das lässt vermuten, dass entweder POP1p in Pflanzen nur noch eine untergeordnete Rolle für die RNase P spielt oder diese Aminosäuren für die Funktionen entbehrlich sind. Über die Aufgaben des POP1 Proteins in RNase MRP

kann zu diesem Zeitpunkt keine Aussage getroffen werden, da hierfür noch keine weiteren Studien vorliegen.

In dieser und einer vorangegangenen Dissertation (Heubeck, 2003) konnte die Assoziation von AtPOP1p mit einem aktiven RNase P-Komplex nachgewiesen werden. Deshalb sollte die Art der Beteiligung an dem Enzymkomplex und die Interaktion von AtPOP1p mit den möglichen RNase MRP RNAs sowie mit pre-tRNA^{Tyr} als RNase P-Substrat durch Gelshiftexperimente untersucht werden. Durch die Bindung des rekombinanten Exon I (also der POP1-Domäne) von AtPOP1p an beide MRP RNAs aus *A. thaliana* konnte für POP1p erstmals gezeigt werden, dass COR I allein für die spezifische Bindung an RNAs ausreichend ist. Eine Beteiligung der anderen Domänen ist *in vitro* nicht absolut notwendig. Ein Einfluss auf die Bindungsstärke und -Spezifität ist jedoch wahrscheinlich. Der geringe Anteil an korrekt gefaltetem Protein kann vermutlich ebenfalls für die schwache Komplexbildung verantwortlich gemacht werden. Um bei zukünftigen Experimenten die Bindungsdaten quantitativ auswerten zu können, muss die Renaturierung des Proteins optimiert werden, um eine höhere Konzentration an aktivem Protein zu erreichen.

Anders als in Hefe (Ziehler et al., 2001) konnte in den hier durchgeführten Versuchen eine Bindung von AtPOP1p an die isolierte P3-Helix der MRPR1 nicht gezeigt werden. Für eine stabile Bindung sind möglicherweise ein oder mehrere weitere Strukturelemente in anderen Bereichen der MRP RNA oder in anderen Domänen des Proteins notwendig. Störend könnte sich auch eine mögliche Dimerisierung der RNA auswirken. Die Bindung von AtPOP1p an die beiden getrennten Domänen der MRPR1 konnte mit entsprechenden Transkriptvarianten gezeigt werden (Abb. 53, S. 136). Die Bindungsstellen des Proteins an MRPR1 könnten zusätzlich durch Footprinting, eventuell nach Stabilisierung durch chemisches (z.B. Formaldehyd) oder durch UV-Crosslinking identifiziert werden (Cordier, 1999; Cordier und Schön, 1999; Will et al., 2005). Nach Proteolyse des Proteins können dabei die Bindungsstellen durch Reverse Transkription ermittelt werden. Um die Aminosäure zu identifizieren, die mit der RNA interagiert, muss sowohl das Protein, als auch die RNA degradiert werden, um die gebundene Aminosäure im hydrolysierten Protein-RNA-Fragment durch MALDI-MS zu identifizieren. Außerdem könnten mutierte Varianten der MRPRs im Bindungsversuch getestet werden. Die Mutationen sollten dabei so gewählt werden, dass dadurch Teile der RNA-Struktur verändert werden.

Da eine Bindung von AtPOP1p an pre-tRNA unter den getesteten Bedingungen nicht erfolgte, ist das Protein vermutlich nicht an der Erkennung des Substrates beteiligt. Das steht im Widerspruch zu Untersuchungen in RNase P aus *Homo sapiens*, in denen die Bindung des

115 kDa Proteins POP1p an pre-tRNAs nachgewiesen wurde (True und Celandier, 1998). Da in der vorliegenden Arbeit eine auf Exon I verkürzte Variante von AtPOP1p untersucht wurde, könnte der C-terminale Teil des Proteins für die Bindung an P3 der MRPR, sowie an pre-tRNAs notwendig sein. Ob AtPOP1p direkt an der RNase P-Aktivität beteiligt bzw. dafür essentiell ist, konnte in dieser Arbeit nicht bewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob AtPOP1p möglicherweise eine Rolle bei der Substraterkennung der RNase MRP spielt, wären Bindungsversuche mit dem rRNA-Vorläufertranskript notwendig. Allerdings ist über die genaue Struktur des MRP-Substrates in Pflanzen nichts bekannt. Eine Rolle von AtPOP1p bei der Reifung der RNase MRP RNA, ähnlich wie in Hefe, kann nach vorliegenden Daten ausgeschlossen werden, da für MRPR1 keine Vorläufer-RNA und für MRPR2 keine prozessierte RNA Variante detektiert werden konnte.

5.4.3 Genstruktur und Expression von *AtRpp30*

Das RNase P/MRP Protein Rpp1/Rpp30 mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa ist wenig charakterisiert. Es gehört mit der RNase P-RNA, POP1 und Rpp29 zum essentiellen Kern des RNase P Enzyms (Aspinall et al., 2007). Bekannt sind nur die Bindung von RNase P-RNA und pre-tRNA. Die Analyse der genomischen Region von *AtRpp30* führte zu sehr unterschiedlichen Annotierungen der Promotorregion. Verschiedene Analyseprogramme detektieren eine 100 bis 460 Bp lange Sequenz vor dem Translationsstart als Promotorregion (PlantProm: Shahmuradov et al., 2003; Athena: O'Connor et al., 2005; Agris: Palaniswamy et al., 2006). Dabei wurden neben verschiedenen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren die Sequenzelemente TATA-Box und TELO-Box erkannt. Letzteres lokalisiert in der 5'-Region zahlreicher Gene des Translationsapparates und reguliert die Genexpression in Wurzelmeristemen durch die Aktivierung der eEF1A-Expression (Tremousaygue et al., 1999).

Bei der Klonierung der kodierenden Region von *AtRpp30* aus einer cDNA-Bibliothek konnten im Rahmen dieser Arbeit drei Spleißisoformen detektiert werden. Bisher ist *AtRpp30p* das zweite RNase P/MRP Protein, für das eine Variation im Spleißmuster vorliegt. Insgesamt konnten die drei Varianten *AtRpp30-1* (581 AS), *AtRpp30-2* (678 AS) und *AtRpp30-3* (705 AS) ermittelt werden (Abb. 30, S. 114). Das differentielle Spleißmuster bewirkt in *AtRpp30-2* eine Rasterverschiebung in Exon VI und in *AtRpp30-3* eine Insertion von 76 Nukleotiden zwischen Exon V und VI, die ebenfalls zu einer Rasterverschiebung führt. In der Datenbank liegen ESTs vor, die einen Teil von Exon I (ES175810; Jones-Rhoades et al., 2007) und Exon V (H36851; Newman et al., 1994) ohne die Exongrenzen enthalten. Ein weiteres EST, das die Exons V bis VII umfasst, zeigt das Spleißmuster von *AtRpp30-1* in Intron V (AI995032). Die Annotation durch TAIR identifizierte bereits die

Spleißmuster von AtRpp30-1 (NM_125391) und AtRpp30-3 (NM_001161317). Diese Arbeit bestätigt erstmals auf experimentellem Weg die beiden Spleißvarianten und fügt eine dritte Variante (AtRpp30-2) sowie eine 74 Nt lange 5'-UTR und drei neue Polyadenylierungs-Stellen hinzu.

Im Western Blot wurden drei Proteine detektiert, die den in dieser Arbeit identifizierten Spleißvarianten entsprechen. Da die Signale mit gleicher Intensität auftraten, scheint es keinen Mechanismus zu geben, der die drei Isoformen während der Expression unterscheidet.

5.4.4 Funktion von AtRpp30p

Auf Proteinebene hat AtRpp30p nur eine geringe Ähnlichkeit mit den Homologen Rpp30p aus Mensch (ca. 13 %) und Rpp1p aus Hefe (ca. 10 %). Ein Sequenzvergleich mit den N-terminalen 250 Aminosäuren von AtRpp30p allein erhöht die Identitäten auf ca. 30 % zu Rpp30p (*H. sapiens*) und ca. 23 % zu Rpp1p (*S. cerevisiae*). Der N-terminale Teil sollte daher für die Funktionen verantwortlich sein, die Rpp30p/Rpp1p in RNase P/MRP ausüben. Verglichen mit dem N-terminalen Teil, enthält der gering konservierte C-Terminus weniger basische (Arg, Lys) und aliphatische (Gly, Leu, Ile, Val, Ala) Aminosäuren und einen erhöhten Anteil neutraler Aminosäuren (Asn, Ser). Das saure Glutamat und Aspartat ist dreimal häufiger vorhanden. Die Analyse dieses Bereiches definiert den an Glutamat und Aspartat reichen (120 AS) C-Terminus als MDN1-Domäne, die in dem Protein Midasin (MIDAS, *metal ion dependent adhesion site*) erstmals beschrieben wurde und auch in AAA+ (*ATPases Associated with a wide variety of cellular Activities*) vorkommt. Die Domäne bildet eine *coiled coil*-Struktur und ist bei der Bindung nicht-nativer Proteine beteiligt (Garbarino und Gibbons, 2002; Martin et al., 2004). Die Aufgabe der AAA+ ATPasen ist die Faltung und Entfaltung von Proteinen in Multiproteinkomplexen. Die Ähnlichkeit der C-terminalen Sequenz von AtRpp30p mit diesen beiden Proteinen könnte auf eine neue Funktion einer RNase P/MRP-Proteinuntereinheit hinweisen. Die Proteinbindungsfähigkeit dieser *coiled coil*-Struktur lässt vermuten, dass RNase P/MRP durch die Rekrutierung von Proteinen, in diesem Fall Rpp30, neue Funktionen angenommen hat.

Da über die Funktionen von Rpp30p im RNase P/MRP-Komplex nur wenig bekannt ist, sollte zuerst das RNA-Bindungsverhalten des Proteins analysiert werden. Die Bindung von AtRpp30p an MRP RNA 1 und 2 aus *A. thaliana* wurde in Gelshiftexperimenten untersucht. Diese Komplexe aggregierten in der Tasche der PAA-Gele und konnten daher nicht weiter analysiert werden. Daher wurde die Bindung an die C-Domäne der MRPR1 untersucht, um Komplexe mit geringerem Molekulargewicht zu erhalten. Tatsächlich konnte die RNA-Bindung auf diese Weise gezeigt werden (Abb. 64, S. 145). Das Ergebnis bestätigt

Untersuchungen zur RNA-Bindungsfähigkeit von Rpp30p-Homologen aus Mensch und dem Schleimpilz *D. discoideum* (Welting et al., 2006; Vourekas et al., 2007). In *D. discoideum* konnte neben der Bindung von DRpp30p an die RNase P-RNA auch eine pre-tRNA-Bindung gezeigt werden (Vourekas et al., 2007). Ob dieses Bindungsverhalten auch auf AtRpp30p zutrifft, muss noch überprüft werden. Für humanes Rpp30p konnte diese Eigenschaft bisher nicht nachgewiesen werden (Sharin et al., 2005).

Um die Assoziation von AtRpp30p mit dem RNase P/MRP-Komplex zu zeigen, wurde eine Immunopräzipitation mit AtRpp30p-spezifischen Antikörpern durchgeführt. In diesem Experiment konnte mit den Antikörpern gegen AtRpp30p-RNase P-Aktivität aus Weizenkeimextrakten präzipitiert werden (Abb. 80, S. 161). Damit kann AtRpp30p als Bestandteil des pflanzlichen RNase P-Komplexes bestätigt werden. Ob dieses Protein tatsächlich eine Funktion bei der tRNA-Spaltung übernimmt oder nur ein akzessorisches Protein an der Peripherie des Komplexes darstellt, muss noch untersucht werden. Da Rpp30 in Mensch und Hefe auch Bestandteil der RNase MRP ist, sollte ein Assay zum Test auf RNase MRP-Aktivität in einem Immunopräzipitat mit Rpp30-spezifischen Antikörpern durchgeführt werden.

5.4.5 Genstruktur und Expression von AtRpp38

Die RNase P- und RNase MRP-Untereinheit POP3p/Rpp38p besitzt ein Molekulargewicht von ca. 38 kDa. Das Protein interagiert mit den RNA-Untereinheiten von RNase P, RNase MRP und mit pre-tRNA (Brusca et al., 2001; Welting et al., 2004). Einen Einfluss von POP3p/Rpp38p auf die Transkription und Lokalisierung anderer Proteinuntereinheiten von RNase P und MRP wurde bereits nachgewiesen (Kovrigina et al., 2003). Die Analyse der Rpp38-Gensequenz in *A. thaliana* identifiziert eine 621 Bp lange Sequenz vor dem Translationsstart als Promotorregion (PlantProm: Shahmuradov et al., 2003; Athena: O'Connor et al., 2005; Agris: Palaniswamy et al., 2006). Dabei wird ein TATA-abhängiger Promotor lokalisiert. Daneben wurden zwei Bindestellen des Transkriptionsfaktors GATA stromaufwärts der TATA-Box lokalisiert, was für einen zweiten TATA-unabhängigen Promotor spricht (Teakle et al., 2002). GATA-Promotorelemente sind Bestandteil der lichtinduzierbaren Transkriptionsregulation.

Die Analyse der AtRpp38-mRNA in den verschiedenen Datenbanken ergab ein eindeutiges Spleißmuster. Die Suche ergab ein EST für AtRpp38 (Abb. 90, S. 249; CD531238; Guo et al., 2004), das in alternden Blättern von *A. thaliana* var. *Landsberg erecta* nachgewiesen wurde. Dieses EST beginnt mit Exon II und zeigt eine Abweichung der Spleißstelle in Intron IV. Diese Spleißvariante führt unmittelbar zur Termination der Translation, die dann ein 93 AS

langes Protein hervorbringt. Es bestätigt das 3'-Ende von AtRpp38 mit einer Abweichung der ersten Polyadenylierungsstelle um eine Base. In dieser Arbeit konnten weitere Polyadenylierungsstellen nachgewiesen werden. Ein weiteres EST, das in Exon V lokalisiert ist, bricht im ersten Drittel dieses Exons ab (EH979801, Weber et al., 2007). Nur zwei ESTs im Exon I enthalten den Translationsstartpunkt (Abb. 90; ES146951, ES095257). Da diese jedoch nur 4-5 Nukleotide vor dem AUG beginnen, muss angenommen werden, dass hier ein Abbruch bei der cDNA-Synthese stattgefunden hat oder die ESTs Abbauprodukte der mRNA durch 5'-3'-Exonukleasen darstellen. Für das 5'-Ende der AtRpp38-mRNA existieren keine weiteren ESTs. Ob auch bei AtRpp38 eine 5' untranslatierte Sequenz transkribiert wird, könnte nur durch eine RACE-Analyse ermittelt werden.

Das kodierte Protein besteht aus 167 Aminosäuren und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 18,6 kDa. Im Western Blot konnte die Expression dieses Proteins mit seinem ungewöhnlichen Laufverhalten in SDS-Gelen erwartungsgemäß bei 22,5 kDa nachgewiesen werden.

Die aus anderen Organismen bekannten Rpp38p-Homologen enthalten bis ca. 280 Aminosäuren. Die in *Arabidopsis thaliana* identifizierte Variante mit 167 AS stellt damit ein kurzes Protein dar. Andere Homologe aus Pflanzen und Pilzen haben eine ähnliche Größe. Tierische Rpp38-Homologe weisen untereinander eine starke Konservierung über die gesamte Primärsequenz auf, die AtRpp38p und seine Homologen in Pflanzen nur in einem kurzen Abschnitt am C-Terminus (Region 90-150 in AtRpp38p) teilen. Die Homologie der Proteine aus Pilzen ist in diesem Teil des Proteins noch geringer. Diese Domäne wird als "Ribosomale L7Ae Superfamilie" (pfam01248) bezeichnet und ist ein konserviertes Merkmal einiger ribosomaler Proteine und von Rpp38-Homologen. Die Proteine mit dieser Domäne spielen offenbar eine Rolle in Zellzyklus und Apoptose (Koonin, 1997). Das Translationsprodukt aus der Spleißvariante des ESTs CD531238 würde diese konservierte Domäne nicht enthalten, so dass der N-terminale Teil vermutlich für den Zellzyklus keine Rolle spielt.

5.4.6 Die Funktion von AtRpp38p

Funktionelle Mutationsanalysen wie im Fall von POP1p sind für Rpp38 nicht publiziert. Dieses Protein ist bei der Regulation der Expression und am Transport anderer RNase P/MRP Proteine beteiligt (Kovrigina et al., 2003; Zhang und Altman, 2004). Eine Bindung an RPR und MRPR konnte für das humane Rpp38 nachgewiesen werden (Welting et al., 2004). Für die Bindungsexperimente mit MRP RNAs aus *A. thaliana* wurde rekombinant hergestelltes AtRpp38p (Dahl, 2003) über eine Nickel-NTA-Sepharose-Säule gereinigt (4.3.13). Anders als bei AtPOP1p konnte die Bindung des Proteins am besten in Tris-Borat gepufferten Gelen

analysiert werden, da die Komplexe in Tris-Glycin gepufferten Gelen nicht stabil waren. Glycin ist ein Ampholyt mit einer Säure (Carboxygruppe: $pK_{s1}=2,34$) und einer Base (Aminogruppe: $pK_{s1}=9,6$). Bei dem pH-Wert des Puffers (pH 8,3) ist das Molekül am Aminoende einfach protoniert. Die Carboxygruppe ist zu 100 %, die Aminogruppe nur zu 5 % dissoziiert ($H_3N^+-CH_2-COO^-$). Glycin kann dadurch ionische Wechselwirkungen ausbilden. Diese Ladungen können vermutlich die Ladungen des Proteins gut abschirmen, so dass ionische Wechselwirkungen mit der RNA nicht zustande kommen. Positiv geladene Amine können zwar als Gegenion zum Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren dessen Ladung abschirmen (Stellwagen et al., 2000a); durch die Zwitterion-Eigenschaft des Glycins ist dies aber nicht möglich. Eine Interaktion des Glycins mit der Nukleinsäure tritt vermutlich nicht auf. Im Tris-Borat-Puffer werden dagegen eher hydrophobe Bedingungen geschaffen. Da Borsäure eine schwache Säure ist ($pK_s = 9,25$), die in 0,5 x TB-Puffer nur zu 0,011 % dissoziiert, überwiegt die Säureeigenschaft bzw. die protonierte Form der Borsäure (H_3BO_3). Die Borsäure komplexiert die RNA über ungepaarte Elektronen in den Sauerstoffatomen und Aminogruppen (Stellwagen et al., 2000b). Da nur jedes hundertste Molekül ein Anion ist ($B(OH)_4^-$), werden die geladenen Aminosäuren des Proteins, die für die Bindung verantwortlich sind, in diesem schwach ionischen Milieu nicht abgeschirmt und es kommt zur Interaktion mit der RNA.

AtRpp38p ist in der Lage, beide MRP RNAs zu binden. Wie AtPOP1p kann es an die getrennte S- und C-Domäne der MRPR1 separat binden, eine Bindung an die isolierte P3 der MRPR1 findet nicht statt (Abb. 62, S. 143). Die ermittelte Bindungskonstante für den AtRpp38p-MRPR1-Komplex liegt mit $k_s = 0,1 \mu M$ im Bereich der Bindungskonstante für die Proteine POP6/7 an MRP RNA aus Hefe (Perederina et al., 2007; Perederina et al., 2010). Dabei muss berücksichtigt werden, dass der Anteil korrekt gefalteter Proteine in Lösung nicht bekannt ist. Die Bindung der Proteine an die RNA wird durch andere RNase P/MRP Proteine gefördert (Pluk et al., 1999; Perederina et al., 2007; Welting et al., 2007). So könnte die Zugabe weiterer RNase P/MRP Proteine, die in dieser Arbeit noch nicht verwendet wurden, zu einer Verbesserung der Bindung führen. Interaktionen von AtRpp38p mit AtPOP1p, AtRpp30p und AtRpp29p konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (4.4.7).

Die Bindung von AtRpp38p an pre-tRNA^{Tyr} (Abb. 62, S. 143) zeigt, dass dieses Protein tRNAs bindet und möglicherweise eine Rolle bei der Bindung, Erkennung oder Prozessierung des Substrates im RNase P-Komplex spielen könnte. Da in Bindungsexperimenten mit MRPR1 gezeigt wurde, dass AtRpp38p einzelsträngige RNA bevorzugt (Abb. 57, S. 139), ist es möglich, dass das Protein die 5'-Flanke der pre-tRNA bindet. Für das Rpp38-Homologe POP3 konnte in Hefe gezeigt werden, dass das Protein eine Region um die

Prozessierungsstelle in der pre-tRNA bindet (Brusca et al., 2001). Damit unterscheidet POP3p/Rpp38p zwischen RNAs z.B. mit einer 5'-flankierenden Einzelstrangsequenz als potenzielles Substrat und RNAs ohne diese Eigenschaft als Nicht-Substrat. In bakterieller RNase P übernimmt das RNase P Protein die Aufgabe, die pre-tRNA-Flanke in dem aktiven Zentrum der RNA zu platzieren und erleichtert so die Prozessierung (Niranjanakumari et al., 1998). Diese Funktion könnte in eukaryotischer RNase P durch POP3p/Rpp38p ausgeführt werden. Rpp38 könnte daher möglicherweise als *shuttle* (passiv oder energieabhängig) für die verschiedenen Substrate funktionieren, das die Substrate bindet, an das Holoenzym heranführt und den Kontakt mit der RNase P/MRP RNA herstellt. Die in Abb. 56 (S. 138) beobachtete Bandenbildung ist ungewöhnlich und beruht vermutlich auf einem Aggregationseffekt des Proteins. Um die Zusammensetzung dieser Komplexe zu bestimmen, könnte die Menge der RNA und des Proteins in diesen Banden analysiert werden.

Da Rpp38p (bzw. POP3p in Hefe) auch andere RNAs unspezifisch bindet, ist es möglich, dass nicht nur pre-tRNAs als Substrat für RNase P in Betracht gezogen werden müssen (Brusca et al., 2001; Coughlin et al. 2008).

Nachdem die Assoziation von AtRpp38p mit RNase P-Aktivität gezeigt wurde (Abb. 80, S. 162), sollte als nächstes überprüft werden, ob Rpp38p auch direkt an der Prozessierung beteiligt ist. Die Bindung an MRP RNAs liefert einen Hinweis darauf, dass eine Interaktion zwischen dem RNase MRP-Komplex und Rpp38 stattfindet. Die Assoziation mit dem RNase MRP-Komplex bzw. Aktivität kann erst nach Etablierung eines Aktivitätstest überprüft werden.

5.4.7 Genstruktur und Expression von AtRpp29p

Das RNase P/MRP Protein POP4/Rpp29 mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa ist wenig charakterisiert. Es gehört mit der RNase P-RNA, POP1 und Rpp30 zum essentiellen Kern des RNase P Enzyms (Aspinall et al., 2007). Das Protein interagiert mit den meisten anderen RNase P/MRP Proteinen und mit RNase P-RNA (Jiang et al., 2001; Houser-Scott et al., 2002; Numata et al., 2004).

Die Promotoranalyse des Rpp29-Gens in *A. thaliana* detektierte weder eine TATA-Box noch das konservierte CCAAT-Element (PlantProm: Shahmuradov et al., 2003; Athena: O'Connor et al., 2005; Agris: Palaniswamy et al., 2006). Einige Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren können jedoch lokalisiert werden. Die Regulation der Transkription von AtRpp29p erfolgt somit offenbar durch einen TATA-unabhängigen Promotortyp. Für AtRpp29p existieren zwei ESTs, die Exon I-III umfassen (DR235922; Alexandrov et al.,

2006; BE522542; White et al., 2000). Beide ESTs enthalten eine 5'-UTR mit einem Intron. Zwei weitere ESTs beginnen am 3'-Ende des Exon III (AV555745; Asamizu et al., 2000; BX838301; Castelli et al., 2004), ein weiteres in Exon VI (BE522541; White et al., 2000). Die drei letztgenannten ESTs haben das gleiche 3'-Ende bzw. Polyadenylierungsstelle, die in dieser Arbeit identifiziert wurden (Abb. 36, S. 122). Eine weitere Polyadenylierungsstelle, die sich *upstream* befindet, konnte in dieser Arbeit identifiziert werden. Die vollständige kodierende Sequenz wurde bereits identifiziert und als Expressionsklon kloniert (Krehan, 2004). In dieser Arbeit wurde der Nachweis der mRNA im Northern Blot und des Proteins im Western Blot durchgeführt. Dabei konnte eine mRNA von ca. 1,0 kB (Abb. 37, S. 123) und ein Protein von 37 kDa (Abb. 74, S. 155) nachgewiesen werden. Eine Spleißvariante der mRNA konnte nicht identifiziert werden. Eine Analyse der mRNA-Transkripte durch 5'-RACE könnte Aufschluss über den Transkriptionsstart geben. Im Western Blot wurde die Expression des Proteins in *A. thaliana*, *L. sativum* und *T. aestivum* mit dem erwarteten Molekulargewicht bei 37 kDa detektiert. Dies bestätigt die identifizierten mRNAs und die Verwandtschaft unter den pflanzlichen Homologen.

5.4.8 Die Funktion von AtRpp29p

Wie für AtPOP1, AtRpp30 und AtRpp38 sollten Funktionsanalysen anhand von RNA-Bindungsversuchen durchgeführt werden. Eine Bindung des Proteins an MRPR1 konnte in den durchgeführten Gelshiftexperimenten nicht beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass AtRpp29p nur Protein-Protein-Wechselwirkungen eingeht bzw. an der Peripherie des Enzymkomplexes lokalisiert ist. Das starke Aggregationsverhalten des rekombinanten Proteins (Krehan, 2004) könnte die Ausbildung von RNA-Protein-Komplexen hemmen und deren Detektion im Gelsystem erschweren. Da für Rpp29p/POP4p aus Hefe und Mensch mehrmals RNA-bindende Eigenschaften nachgewiesen wurden (Jiang et al., 2001; Houser-Scott et al., 2002; Mann et al., 2003; Sharin et al., 2005; Aspinall et al., 2007), müssen die Bedingungen für dieses Protein weiter optimiert werden. Dabei könnte das basische Puffersystem beispielsweise von Tris-Borat/ Tris-Glycin zu acideren Puffern wie β -Alanin/Acetat (pH4,4), Histidin/MES (pH6,1) oder Imidazol/HEPES (pH 7,4) geändert werden. Die Sequenzähnlichkeit zwischen AtRpp29p und den Homologen Rpp29 (Mensch) und POP4 (Hefe) ist mit 13/15 % relativ gering. Ein Vergleich der C-terminalen Domänen erhöht die Ähnlichkeit auf 21/29 %. Diese hohe Identität deutet auf gleiche Funktionen hin. Die strukturell analysierten Rpp29-Homologen aus *P. horikoshii*, *A. fulgidus* und *M. thermophilus* formen eine β -Fassstruktur ähnlich der Sm-Proteine, die Homo- und Heterooligomerisierungen unterliegen, um RNAs zu binden (Kambach et al., 1999; Collins

et al., 2001, Mura et al., 2001, Schumacher et al., 2002). Dies würde die starke Aggregation des AtRpp29p in der Gelelektrophorese erklären. Die Aminosäuren R₇₅ und N₇₆ und ein Cluster basischer Aminosäuren in Ph1771p/Rpp29p aus *P. horikoshii* werden als essentiell für die RNA-Bindung vermutet. Die beiden genannten Aminosäuren werden in AtRpp29 durch Serin und Glutamat ersetzt, der basische Cluster fehlt. Das ist eine mögliche Ursache für das Ausbleiben der RNA-Bindung. Versuche zur Rekonstitution von RNase P-Aktivität mit Rpp29, Rpp21 und H1-RNA (*H. sapiens*), sowie mit Rpp29p (*H. sapiens*) und M1-RNA (*E. coli*) zeigten, dass dieses Protein eine zentrale Rolle bei der pre-tRNA-Prozessierung einnimmt (Mann et al., 2003; Sharin et al., 2005). Der Nachweis der Assoziation des Proteins mit dem RNase P-Komplex, wie er für AtPOP1p, AtRpp38p und AtRpp30p gezeigt wurde, sollte daher noch durchgeführt werden. Ein Rekonstitutionsversuch von RNase P-Aktivität mit den MRP RNAs aus *A. thaliana* im Vergleich zu den RNase P-RNAs aus *H. sapiens* bzw. *E. coli* könnte daraufhin zeigen, ob die Funktionen von AtRpp29p mit der von Rpp29 aus *H. sapiens* übereinstimmt. Damit würde eine sehr wichtige Information gewonnen, inwiefern sich pflanzliche und menschliche RNase P in ihrer Wirkungsweise ähneln bzw. unterscheiden.

6. *Ausblick*

Die Zielstellung dieser Arbeit war, die Zusammensetzung der RNase P bzw. MRP in pflanzlichen Zellkernen zu charakterisieren. Dafür wurden verschiedene Proteine und RNAs mittels Sequenzvergleich von Homologen bekannter Eukaryoten identifiziert und funktionell analysiert. Die zentrale Frage war, ob in diesen Komplexen eine RNA-Untereinheit vorhanden ist.

Um eine solche RNA zu identifizieren, könnte als Weiterführung der vorliegenden Arbeit mit Antikörpern gegen die rekombinanten Proteine aus *Arabidopsis thaliana* der RNase P-Komplex aus prozessierungsaktiven Weizenkeim-Extrakten oder *A. thaliana*-Proteinpräparationen isoliert und über quervernetzte Immunopräzipitation (CLIP) analysiert werden. Dabei sollte nach einer Methode zur Trennung der Aktivitäten von RNase P und MRP gesucht werden. Da in Mensch das Protein Rpp21p bzw. das homologe Rpr2p in Hefe sowie die humanen Rpp40p und Rpp14p nur in RNase P-Komplexen nachgewiesen wurden (Walker und Engelke 2006; Tab. 1, S. 28), bietet die Suche nach den homologen Proteinen in Pflanzen eine Möglichkeit, die Isolierung beider Enzymkomplexe durchzuführen. Während ein Rpp14/POP5 homologes Protein in *A. thaliana* bereits identifiziert werden konnte (Braun, 2007), wurde auch durch ausgiebige Datenbank-Recherchen bisher kein Rpp21/Rpr2p Homolog in pflanzlichen Genomen identifiziert. Eine Trennung durch Chromatografie oder durch isopyknische Zentrifugation ist eine Option mit geringen Aussichten auf Erfolg, da die beiden Komplexe sehr ähnlich sind. Eine erfolgversprechende Alternative wäre die Affinitätschromatografie mit immobilisierten Substraten. Die Lokalisierung der RNAs von RNase P bzw. MRP ist eine Möglichkeit, beide voneinander zu unterscheiden. Während RPR im Nukleoplasma verteilt ist, akkumuliert MRPR auch in den Nukleoli (Lee et al., 1996; Jacobson et al. 1997). Mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) könnten fluoreszenzmarkierte RNAs (direkt oder indirekt mit Antikörpern) in Zellkernen von *A. thaliana* nachgewiesen werden.

Um die Beteiligung der RNase P/MRP RNAs an der RNase P- oder MRP-Aktivität *in vivo* nachzuweisen, könnten eine oder beide MRP RNAs durch siRNA oder als konditionale *knockout*-Mutante in *Arabidopsis thaliana* ausgeschaltet werden, um den Einfluss auf die tRNA- bzw. rRNA-Prozessierung zu untersuchen. Eine weitere Möglichkeit, den Zusammenhang von RNase P-Aktivität mit den MRP RNAs *in vitro* nachzuweisen bzw. auszuschließen, wäre die Rekonstitution von RNase P-Aktivität aus den humanen Proteinen Rpp29p und Rpp21p mit den MRP RNAs aus *A. thaliana*.

Die Untersuchung der Bindung der Proteine an die RNase P/MRP RNAs durch Gelshiftexperimente ermöglichte, die Bindung qualitativ zu analysieren. Dennoch birgt dieses System für die quantitative Auswertung einige Schwierigkeiten, wie z.B. hohe Schwankungen der Werte besonders bei geringer Komplexbildung, Unschärfe der Komplexbanden sowie das Verbleiben von Komplexen in den Taschen des Gels. Darüber hinaus konnten nicht alle Proteine bzw. deren RNA-Bindung im Gel analysiert werden. Eine alternative Methode wäre ein *Pull-down-assay* der Protein-RNA-Komplexe. Die Erfahrungen bei der Reinigung der hier verwendeten Proteine mit His₆-Tag zeigten, dass die Proteine nur unter denaturierenden Bedingungen isoliert werden konnten, was sich nicht mit den Komplexbildungsbedingungen verträgt. Für diese könnten die Proteine mit einem GST-Tag (Glutathion S-Transferase), MBP-Tag (Maltose Bindendes Protein) oder FLAG-Tag (Aminosäuren F, L, A, G) fusioniert werden, die eine Isolierung der Proteine bzw. der Protein-RNA-Komplexe unter nativen Bedingungen erleichtern (Chamberlain et al., 1998; Welting et al., 2004). Ein weiterer Vorteil dieses Assays ist die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die im Gelsystem nicht möglich sind. Um die Bindungseigenschaften der Proteine an die RNA genauer zu untersuchen, können Punkt- und Deletionsmutanten der Proteine weitere Informationen liefern. Das würde Aufschluss darüber geben, welche Aminosäuren tatsächlich für die Bindung verantwortlich sind. Alternativ könnten die Proteine mit der RNA vernetzt werden, um die intakten Fragmente nach einer partiellen RNA-Hydrolyse zu analysieren. Dies könnte über RACE-PCR oder gelanalytisch geschehen. Als Vorlage für AtPOP1p könnten die Informationen des Hefeproteins verwendet werden, um gezielte Mutationen einzuführen und zu testen.

Die Strategie, die MRP RNA1 in C- und S-Domäne zu teilen, war erfolgreich und zeigte, dass die Proteine AtPOP1p und AtRpp38p an die RNAs MRPR1 und 2 und an beide Domänen der MRPR1 unabhängig binden. Die Bindung scheint nach bisherigen Erkenntnissen weitgehend sequenzunabhängig zu sein. Keines der beiden Proteine zeigte Bindungsunterschiede zwischen den beiden MRP RNAs aus *A. thaliana*. Das Wissen könnte genutzt werden, um Teile des Komplexes (einzelne Proteine und weitere Bindungspartner) aus einem Rohlysatz zu isolieren und Informationen über die räumliche Anordnung der Proteine im Komplex zu gewinnen.

Da die Funktionen der Proteine in *A. thaliana* noch weitestgehend unklar sind, sollten *in vivo* Untersuchungen unternommen werden. Hier könnten Mutationsanalysen Aufschluss darüber geben, ob und wie die Proteine AtPOP1p, AtRpp30p, AtRpp38p, AtRpp29p und AtRpp14p einen Einfluss auf den tRNA- und rRNA-Haushalt haben.

7. Zusammenfassung

Ribonuklease P (RNase P) ist eine essentielle Endonuklease, die die 5'-Flanke von pre-tRNAs entfernt. Als ubiquitäres Enzym existiert RNase P in allen Organismen sowie den genetisch kompetenten Organellen der eukaryotischen Zelle: Kern, Mitochondrien und Chloroplasten. In allen bisher genauer untersuchten Organismen besteht RNase P aus einer RNA-Untereinheit (RPR) und bis zu zehn Protein-Untereinheiten (Rpp bzw. POP). RNase P ist also wie das Spleißosom und das Ribosom ein Ribonukleoprotein. In zahlreichen Organismen wird die enzymatische Reaktion, also die Spaltung einer Phosphodiesterbindung in der pre-tRNA von der RNase P RNA durchgeführt. Dies konnte *in vitro* in Abwesenheit der Proteinkomponenten nachgewiesen werden. Die RNA ist deshalb ein Ribozym. Im Gegensatz dazu wird die Reaktion in menschlichen Mitochondrien von einem Komplex aus mindestens drei Proteinen, in pflanzlichen Mitochondrien und Chloroplasten von nur einem Protein durchgeführt.

Eine weitere Endonuklease ist die RNase MRP (*Mitochondrial RNA Processing*), die mit der RNase P bis zu acht Proteine gemeinsam hat. Ein Unterschied ist die eigene RNA-Untereinheit sowie die Funktion. Für RNase MRP wurden verschiedene Funktionen nachgewiesen. So ist die RNase MRP an der Reifung von 5,8S rRNA und am Abbau der CL2B-mRNA beteiligt. Für die mitochondriale DNA-Replikation stellt es die RNA-Primer aus den Primärtranskripten mitochondrialer DNA her. Sie ist an der Zellzykluskontrolle und Chromosomensegregation beteiligt und hat beim Zusammenbau der Ribosomen eine regulierende Funktion. Verschiedene Mutationen im Gen der humanen RNase MRP RNA führen daher beim Menschen zu schweren Wachstumsbehinderungen. Während die RNase P/MRP in den Eukaryoten Hefe und Mensch sehr detailliert untersucht wurden, gibt es bis dato nur wenig Wissen über die RNase P/MRP in Pflanzen.

In dieser Arbeit wurden vier Proteine untersucht, die eine Homologie zu den menschlichen RNase P/MRP Proteinen hPOP1, Rpp30, Rpp38 und Rpp29 zeigen. Der Fokus dieser Arbeit lag dabei in der Charakterisierung der Transkriptions- und Translationsprodukte. Dabei wurde für AtPOP1 eine neue mRNA-Variante und für AtRpp30 drei Spleißvarianten identifiziert. Im Falle der beiden anderen Untereinheiten AtRpp38 und AtRpp29 wurden die annotierten mRNAs bestätigt. Die vier Proteine bzw. einzelne Domänen wurden in *E. coli* überproduziert, mittels Affinitätsreinigung isoliert und zur Antikörperproduktion verwendet. Im Immunoblot konnten die Proteine mit diesen spezifischen Antikörpern im *Arabidopsis thaliana*

Proteinextrakt sowie im Weizenkeimproteinextrakt nachgewiesen werden. Zwei als RNase MRP-Typ annotierte RNAs wurden in dieser Arbeit *in vivo* nachgewiesen und für funktionelle Studien *in vitro* verwendet.

Um zu zeigen, ob die beiden bekannten *A. thaliana*-RNAs ein Bestandteil der RNase P/MRP-Komplexe sind, wurden die Interaktionen der beiden RNAs mit den vier Proteinen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine AtPOP1p und AtRpp38p spezifisch mit beiden RNAs interagieren. Die quantitative Auswertung der Komplexe bestätigt Messungen in anderen Organismen. Mit dem Protein AtRpp30p konnten ebenfalls RNA-Protein-Komplexe gebildet werden. Diese Komplexbildung ist ein erster Hinweis auf die Beteiligung dieser drei Proteine und der beiden RNAs in den RNase P/MRP-Komplexen in Pflanzen.

Weitere biochemische Untersuchungen des RNase P/MRP-Komplexes wurden im RNA-Prozessierungssystem aus Weizenkeimen durchgeführt. Antikörper gegen AtPOP1p präzipitierten RNase P-Aktivität aus diesem Weizenkeimextrakt. Um eine mögliche RNase P/MRP RNA in diesen Präparationen nachweisen zu können, musste zuerst die Qualität der RNA-Präparationen und die Effizienz der Analysemethode validiert werden. Hierzu wurde zunächst die vollständige Sequenz der MRP RNAs aus Weizen ermittelt. In dieser Arbeit wurden zwei RNA-Sequenzen durch RT-PCR bestimmt, die sich nur durch wenige Basen unterscheiden. Die Analyse des AtPOP1-spezifischen Immunopräzipitats zeigte nur eine der beiden RNase P/MRP RNA-Varianten. Die Analyse chromatografisch gereinigter RNase P aus demselben Weizenkeimextrakt enthielt dagegen beide Spezies. Der Unterschied kann mit der unterschiedlichen Spezifität der beiden Reinigungsmethoden erklärt werden. Trotz der geringen Unterschiede der beiden RNAs zueinander, ist offenbar nur eine mit dem POP1-Protein assoziiert. Da diese RNAs strukturell den beiden RNAs aus *A. thaliana* ähnlich sind, wurde überprüft, ob eine der *A. thaliana*-RNAs *in vitro* RNase P-Aktivität besitzt. Unter den gewählten Bedingungen konnte der Nachweis nicht eindeutig erbracht werden, was ein möglicher Hinweis auf eine Übertragung der Funktion von der RNA auf Proteine sein könnte.

In dieser Arbeit wurden Grundlagen geschaffen, um das RNase P/MRP-System in Pflanzen genauer zu verstehen. Dabei konnte die Frage nach einer RNase P-RNA in nukleärer RNase P nicht abschließend geklärt werden. Mit den in dieser Arbeit erhaltenen neuen RNA- und Proteinsequenzen, rekombinanten Proteinen und spezifischen Antikörpern wird die Isolierung und weitere Charakterisierung des RNase P/MRP-Komplexes *in vivo* und *in vitro* ermöglicht.

8. Summary

Ribonuclease P (RNase P) is the essential endonuclease responsible for 5' processing of all pre-tRNAs. In all studied organisms, RNase P is composed of one RNA subunit (RPR) and up to ten proteins. In contrast, cleavage of the 5' flank in human mitochondria is accomplished by a complex of at least three proteins without an RNA subunit. However, there is unexpected variability in composition and function of RNase P, even between eukaryotic cells.

The structurally related RNase P and RNase MRP share up to eight protein subunits, but have different RNA components and substrates. RNase MRP is involved in the maturation of mitochondrial 5,8S rRNA. RNase P and MRP from yeast and human cells are well studied, but there is little knowledge about the enzymes in plants.

In this work four proteins were characterised that show sequence homology to the RNase P/MRP protein subunits hPOP1, Rpp30, Rpp38 and Rpp29. The focus of the work was on characterization of the transcription and translation products. For AtPOP1 a new mRNA variant was found and for AtRpp30 three splicing isoforms were identified. The annotated mRNAs of AtRpp38 and AtRpp29 have been confirmed. The four proteins were expressed in *E.coli*, isolated by affinity chromatography and used for antibody production. The specific antibodies were used for detection of the corresponding proteins in Western blots of protein extracts from *Arabidopsis thaliana* as well as from wheat germ. Two noncoding RNAs from *Arabidopsis* that were annotated as RNase MRP RNA were detected *in vivo* and used for functional studies *in vitro*.

In order to show that the annotated *Arabidopsis thaliana* RNase P/MRP RNAs (MRPR) are part of the RNase P or MRP complex, the interactions of the RNAs with the four proteins were studied. Both RNAs were able to form detectable complexes with the proteins AtPOP1p and AtRpp38p. Quantitative analysis shows binding constants similar to the human system. AtRpp30p was also able to form complexes with the MRP RNAs. These interaction studies are the first hint for that the three proteins and the two RNAs are part of the RNase P or MRP complex in plants.

Further biochemical analysis of the RNase P/MRP complex was performed with the RNA-processing system from wheat germ. Prior to the identification of a possible RNase P/MRP RNA candidate in these preparations, the quality of the RNA preparations and the efficiency of the analysis method had to be evaluated. To this end, the complete sequence of MRP RNAs from wheat was determined. Using RT-PCR, two sequences were obtained which differ only in a few positions and are very similar to the known sequences from *Arabidopsis* and rice.

Analysis of an AtPOP1-specific immunoprecipitate showed only one of the variants. This finding is supported by the RNA identified in purified RNase P from the same wheat germ extract. As these RNAs show structural similarity to the RNAs from *Arabidopsis thaliana*, an RNase P activity assay was performed with the MRP RNAs. As there is no measurable activity, this finding supports the idea of a transfer of cleavage activity from RNA to protein.

This work gained new insights about the components of the RNase P/MRP-complex in plants. The question if there is an RNase P RNA in the nuclei of plants could not be answered unambiguously. The novel RNA and protein sequences, recombinant proteins and specific antibodies obtained in this work will allow the purification and further analysis of the RNase P/MRP complex *in vitro* and *in vivo*.

9. Literaturverzeichnis

1. **Alexandrov, A., Chernyakov, I., Gu, W., Hiley, S. L., Hughes, T. R., Grayhack, E. J. und Phizicky, E. M.** (2006). Rapid tRNA decay can result from lack of nonessential modifications. *Mol. Cell.* 21, 87-96.
2. **Alifano, P., Rivellini, F., Piscitelli, C., Arraiano, C. M., Bruni, C. B. und Carlomagno, M. S.** (1994). Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease P-dependent processing of a polycistronic mRNA. *Genes Dev.* 8, 3021-3031.
3. **Altman, S. und Smith, J. D.** (1971). Tyrosine tRNA precursor molecule polynucleotide sequence. *Nat. New Biol.* 233, 35-39.
4. **Altman, S., Gopalan, V. und Vioque, A.** (2000). Varieties of RNase P: a nomenclature problem? *RNA.* 6, 1689-1694.
5. **Altman, S., Wesolowski, D., Guerrier-Takada, C. und Li, Y.** (2005). RNase P cleaves transient structures in some riboswitches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11284-11289.
6. **Aravind, L. und Koonin, E. V.** (1999). G-patch: a new conserved domain in eukaryotic RNA-processing proteins and type D retroviral polyproteins. *Trends Biochem. Sci.* 24, 342-344.
7. **Aravind, L., Iyer, L. M. und Anantharaman, V.** (2003). The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism. *Genome Biol.* 4, R64.
8. **Arends, S.** (1996). Charakterisierung der nukleären RNase P aus Weizen. Institut für Biochemie.
9. **Arends, S. und Schön, A.** (1997). Partial purification and characterization of nuclear ribonuclease P from wheat. *Eur. J. Biochem.* 244, 635-645.
10. **Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S. und Tabata, S.** (2000). A large scale analysis of cDNA in *Arabidopsis thaliana*: generation of 12,028 non-redundant expressed sequence tags from normalized and size-selected cDNA libraries. *DNA Res.* 7, 175-180.
11. **Aspinall, T. V., Gordon, J. M., Bennett, H. J., Karahalios, P., Bukowski, J. P., Walker, S. C., Engelke, D. R. und Avis, J. M.** (2007). Interactions between subunits of *Saccharomyces cerevisiae* RNase MRP support a conserved eukaryotic RNase P/MRP architecture. *Nucleic Acids Res.* 35, 6439-6450.
12. **Autio, K. J., Kastaniotis, A. J., Pospiech, H., Miinalainen, I. J., Schonauer, M. S., Dieckmann, C. L. und Hiltunen, J. K.** (2008). An ancient genetic link between vertebrate mitochondrial fatty acid synthesis and RNA processing. *FASEB J.* 22, 569-578.
13. **Baer, M., Nilsen, T. W., Costigan, C. und Altman, S.** (1990). Structure and transcription of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P. *Nucleic Acids Res.* 18, 97-103.

14. **Bartkiewicz, M., Gold, H. und Altman, S.** (1989). Identification and characterization of an RNA molecule that copurifies with RNase P activity from HeLa cells. *Genes Dev.* 3, 488-499.
15. **Baum, M. und Schön, A.** (1996). Localization and expression of the closely linked cyanelle genes for RNase P RNA and two transfer RNAs. *FEBS Lett.* 382, 60-64.
16. **Baum, M., Cordier, A. und Schön, A.** (1996). RNase P from a photosynthetic organelle contains an RNA homologous to the cyanobacterial counterpart. *J. Mol. Biol.* 257, 43-52.
17. **Bertrand, E., Houser-Scott, F., Kendall, A., Singer, R. H. und Engelke, D. R.** (1998). Nucleolar localization of early tRNA processing. *Genes Dev.* 12, 2463-2468.
18. **Boomershine, W. P., McElroy, C. A., Tsai, H. Y., Wilson, R. C., Gopalan, V. und Foster, M. P.** (2003). Structure of Mth11/Mth Rpp29, an essential protein subunit of archaeal and eukaryotic RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15398-15403.
19. **Bothwell, A. L., Stark, B. C. und Altman, S.** (1976). Ribonuclease P substrate specificity: cleavage of a bacteriophage phi80-induced RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 1912-1916.
20. **Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
21. **Braun, S.** (2007). Klonierung und Expressionsstudien des eukaryoten RNase P-Proteins Rpp14/POP5. Diplomarbeit, Universität Leipzig, Institut für Biologie.
22. **Brännvall, M. und Kirsebom, L. A.** (2001). Metal ion cooperativity in ribozyme cleavage of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12943-12947.
23. **Brännvall, M., Fredrik Pettersson, B. M. und Kirsebom, L. A.** (2002). The residue immediately upstream of the RNase P cleavage site is a positive determinant. *Biochimie.* 84, 693-703.
24. **Brännvall, M., Pettersson, B. M. und Kirsebom, L. A.** (2003). Importance of the +73/294 interaction in *Escherichia coli* RNase P RNA substrate complexes for cleavage and metal ion coordination. *J. Mol. Biol.* 325, 697-709.
25. **Brännvall, M. und Kirsebom, L. A.** (2005). Complexity in orchestration of chemical groups near different cleavage sites in RNase P RNA mediated cleavage. *J. Mol. Biol.* 351, 251-257.
26. **Brown, J. W.** (1999). The Ribonuclease P Database. *Nucleic Acids Res.* 27, 314.
27. **Brusca, E. M., True, H. L. und Celander, D. W.** (2001). Novel RNA-binding properties of Pop3p support a role for eukaryotic RNase P protein subunits in substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 276, 42543-42548.
28. **Buck, A. H., Kazantsev, A. V., Dalby, A. B. und Pace, N. R.** (2005). Structural perspective on the activation of RNase P RNA by protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 958-964.

29. **Buck, A. H., Dalby, A. B., Poole, A. W., Kazantsev, A. V. und Pace, N. R.** (2005). Protein activation of a ribozyme: the role of bacterial RNase P protein. *EMBO J.* 24, 3360-3368.
30. **Burd, C. G. und Dreyfuss, G.** (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science.* 265, 615-621.
31. **Cai, T., Reilly, T. R., Cerio, M. und Schmitt, M. E.** (1999). Mutagenesis of SNM1, which encodes a protein component of the yeast RNase MRP, reveals a role for this ribonucleoprotein endoribonuclease in plasmid segregation. *Mol. Cell Biol.* 19, 7857-7869.
32. **Castelli, V., Aury, J. M., Jaillon, O., Wincker, P., Clepet, C., Menard, M., Cruaud, C., Quetier, F., Scarpelli, C., Schachter, V., Temple, G., Caboche, M., Weissenbach, J. und Salanoubat, M.** (2004). Whole genome sequence comparisons and "full-length" cDNA sequences: a combined approach to evaluate and improve *Arabidopsis* genome annotation. *Genome Res.* 14, 406-413.
33. **Chamberlain, J. R., Lee, Y., Lane, W. S. und Engelke, D. R.** (1998). Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes Dev.* 12, 1678-1690.
34. **Chang, D. D. und Clayton, D. A.** (1987). A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science.* 235, 1178-1184.
35. **Chang, D. D. und Clayton, D. A.** (1989). Mouse RNAase MRP RNA is encoded by a nuclear gene and contains a decamer sequence complementary to a conserved region of mitochondrial RNA substrate. *Cell.* 56, 131-139.
36. **Chen, D. und Huang, S.** (2001). Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J. Cell Biol.* 153, 169-176.
37. **Chen, J. L. und Pace, N. R.** (1997). Identification of the universally conserved core of ribonuclease P RNA. *RNA.* 3, 557-560.
38. **Chen, Y., Li, X. und Gegenheimer, P.** (1997). Ribonuclease P catalysis requires Mg^{2+} coordinated to the pro-RP oxygen of the scissile bond. *Biochemistry.* 36, 2425-2438.
39. **Christian, E. L., McPheeters, D. S. und Harris, M. E.** (1998). Identification of individual nucleotides in the bacterial ribonuclease P ribozyme adjacent to the pre-tRNA cleavage site by short-range photo-cross-linking. *Biochemistry.* 37, 17618-17628.
40. **Christian, E. L. und Harris, M. E.** (1999). The track of the pre-tRNA 5' leader in the ribonuclease P ribozyme-substrate complex. *Biochemistry.* 38, 12629-12638.
41. **Chu, S., Zengel, J. M. und Lindahl, L.** (1997). A novel protein shared by RNase MRP and RNase P. *RNA.* 3, 382-391.
42. **Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2172-2175.

43. **Collins, B. M., Harrop, S. J., Kornfeld, G. D., Dawes, I. W., Curmi, P. M. und Mabbutt, B. C.** (2001). Crystal structure of a heptameric Sm-like protein complex from archaea: implications for the structure and evolution of snRNPs. *J. Mol. Biol.* 309, 915-923.
44. **Collins, L. J., Moulton, V. und Penny, D.** (2000). Use of RNA secondary structure for studying the evolution of RNase P and RNase MRP. *J. Mol. Evol.* 51, 194-204.
45. **Cordier, A.** (1998). Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der RNase P aus den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa*. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Biochemie.
46. **Cordier, A. und Schön, A.** (1999). Cyanelle RNase P: RNA structure analysis and holoenzyme properties of an organellar ribonucleoprotein enzyme. *J. Mol. Biol.* 289, 9-20.
47. **Coughlin, D. J., Pleiss, J. A., Walker, S. C., Whitworth, G. B. und Engelke, D. R.** (2008). Genome-wide search for yeast RNase P substrates reveals role in maturation of intron-encoded box C/D small nucleolar RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 12218-12223.
48. **Dahl, J.** (2003). Klonierung und Überexpression des RNase P Proteins Rpp38 aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität Leipzig, Institut für Biochemie.
49. **Dang, Y. L. und Martin, N. C.** (1993). Yeast mitochondrial RNase P. Sequence of the RPM2 gene and demonstration that its product is a protein subunit of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 268, 19791-19796.
50. **Darr, S. C., Brown, J. W. und Pace, N. R.** (1992). The varieties of ribonuclease P. *Trends Biochem. Sci.* 17, 178-182.
51. **de la Cruz, J. und Vioque, A.** (2003). A structural and functional study of plastid RNAs homologous to catalytic bacterial RNase P RNA. *Gene.* 321, 47-56.
52. **Dlatic, M.** (2005). 3D models of yeast RNase P/MRP proteins Rpp1p and Pop3p. *RNA.* 11, 123-127.
53. **Entelis, N. S., Kieffer, S., Kolesnikova, O. A., Martin, R. P. und Tarassov, I. A.** (1998). Structural requirements of tRNA^{Lys} for its import into yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2838-2843.
54. **Fang, X. W., Yang, X. J., Littrell, K., Niranjanakumari, S., Thiagarajan, P., Fierke, C. A., Sosnick, T. R. und Pan, T.** (2001). The *Bacillus subtilis* RNase P holoenzyme contains two RNase P RNA and two RNase P protein subunits. *RNA.* 7, 233-241.
55. **Frank, D. N. und Pace, N. R.** (1998). Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 153-180.
56. **Frank, D. N., Adamidi, C., Ehringer, M. A., Pitulle, C. und Pace, N. R.** (2000). Phylogenetic-comparative analysis of the eukaryal ribonuclease P RNA. *RNA.* 6, 1895-1904.

57. **Franklin, S. E., Zwick, M. G. und Johnson, J. D.** (1995). Characterization and partial purification of two pre-tRNA 5'-processing activities from *Daucus carota* (carrot) suspension cells. *Plant J.* 7, 553-563.
58. **Garbarino, J. E. und Gibbons, I. R.** (2002). Expression and genomic analysis of midasin, a novel and highly conserved AAA protein distantly related to dynein. *BMC Genomics.* 3, 18.
59. **Gegenheimer, P.** (1996). Structure, mechanism and evolution of chloroplast transfer RNA processing systems. *Mol. Biol. Rep.* 22, 147-150.
60. **Gill, T., Cai, T., Aulds, J., Wierzbicki, S. und Schmitt, M. E.** (2004). RNase MRP cleaves the CLB2 mRNA to promote cell cycle progression: novel method of mRNA degradation. *Mol. Cell Biol.* 24, 945-953.
61. **Gill, T., Aulds, J. und Schmitt, M. E.** (2006). A specialized processing body that is temporally and asymmetrically regulated during the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 173, 35-45.
62. **Gimple, O. und Schön, A.** (2001). *In vitro* and *in vivo* processing of cyanelle tmRNA by RNase P. *Biol. Chem.* 382, 1421-1429.
63. **Glemarec, C., Kufel, J., Földesi, A., Maltseva, T., Sandström, A., Kirsebom, L. A. und Chattopadhyaya, J.** (1996). The NMR structure of 31mer RNA domain of *Escherichia coli* RNase P RNA using its non-uniformly deuterium labelled counterpart [the 'NMR-window' concept]. *Nucleic Acids Res.* 24, 2022-2035.
64. **Gobert, A., Gutmann, B., Taschner, A., Gössringer, M., Holzmann, J., Hartmann, R. K., Rossmann, W. und Giege, P.** (2010). A single *Arabidopsis* organellar protein has RNase P activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 740-744.
65. **Gold, H. A., Topper, J. N., Clayton, D. A. und Craft, J.** (1989). The RNA processing enzyme RNase MRP is identical to the Th RNP and related to RNase P. *Science.* 245, 1377-1380.
66. **Gopalan, V., Baxevanis, A. D., Landsman, D. und Altman, S.** (1997). Analysis of the functional role of conserved residues in the protein subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *J Mol. Biol.* 267, 818-829.
67. **Gopalan, V.** (2007). Uniformity amid diversity in RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2031-2032.
68. **Gray, M. W.** (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.* 5, 294-299.
69. **Green, P. J.** (1994). The Ribonucleases of Higher-Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 45, 421-445.
70. **Gruber, A. und Zingales, B.** (1995). Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques.* 19, 28, 30.

71. **Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. und Altman, S. (1983).** The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*. 35, 849-857.
72. **Guerrier-Takada, C., Haydock, K., Allen, L. und Altman, S. (1986).** Metal ion requirements and other aspects of the reaction catalyzed by M1 RNA, the RNA subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 25, 1509-1515.
73. **Guerrier-Takada, C., van Belkum, A., Pleij, C. W. und Altman, S. (1988).** Novel reactions of RNAase P with a tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA. *Cell*. 53, 267-272.
74. **Guerriero, V. Jr. und Dunham, V. L. (1979).** The Presence of a Ribonuclease of High Molecular Weight in Sugar Beet Storage Tissue. *Physiologia plantarum*. 47, 15-18.
75. **Haas, E. S., Banta, A. B., Harris, J. K., Pace, N. R. und Brown, J. W. (1996).** Structure and evolution of ribonuclease P RNA in Gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res.* 24, 4775-4782.
76. **Hall, T. A. und Brown, J. W. (2002).** Archaeal RNase P has multiple protein subunits homologous to eukaryotic nuclear RNase P proteins. *RNA*. 8, 296-306.
77. **Hands-Taylor, K. L., Martino, L., Tata, R., Babon, J. J., Bui, T. T., Drake, A. F., Beavil, R. L., Pruijn, G. J., Brown, P. R. und Conte, M. R. (2010).** Heterodimerization of the human RNase P/MRP subunits Rpp20 and Rpp25 is a prerequisite for interaction with the P3 arm of RNase MRP RNA. *Nucleic Acids Res.* 38, 4052-4066.
78. **Hara, T., Terada, A., Yamaguchi, H., Nakashima, T., Kakuta, Y. und Kimura, M. (2011).** The contribution of peripheral stem-loops to the catalytic activity of archaeal RNase P RNA from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 816-819.
79. **Harris, M. E., Nolan, J. M., Malhotra, A., Brown, J. W., Harvey, S. C. und Pace, N. R. (1994).** Use of photoaffinity crosslinking and molecular modeling to analyze the global architecture of ribonuclease P RNA. *EMBO J.* 13, 3953-3963.
80. **Harris, M. E. und Christian, E. L. (2003).** Recent insights into the structure and function of the ribonucleoprotein enzyme ribonuclease P. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 325-333.
81. **Hartmann, R. K., Heinrich, J., Schlegl, J. und Schuster, H. (1995).** Precursor of C4 antisense RNA of bacteriophages P1 and P7 is a substrate for RNase P of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5822-5826.
82. **Heide, C., Busch, S., Feltens, R. und Hartmann, R. K. (2001).** Distinct modes of mature and precursor tRNA binding to *Escherichia coli* RNase P RNA revealed by NAIM analyses. *RNA*. 7, 553-564.
83. **Hess, W. R., Fingerhut, C. und Schön, A. (1998).** RNase P RNA from *Prochlorococcus marinus*: contribution of substrate domains to recognition by a cyanobacterial ribozyme. *FEBS Lett.* 431, 138-142.

84. **Heubeck, C. und Schön, A.** (2001). Cyanelle ribonuclease P: isolation and structure-function studies of an organellar ribonucleoprotein enzyme. *Methods Enzymol.* 342, 118-134.
85. **Heubeck, C.** (2003). Zusammensetzung eukaryotischer RNase P aus pflanzlichen Zellkernen und Plastiden. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Biochemie.
86. **Hollingsworth, M. J. und Martin, N. C.** (1986). RNase P activity in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* depends on both mitochondrion and nucleus-encoded components. *Mol. Cell Biol.* 6, 1058-1064.
87. **Holzmann, J., Frank, P., Löffler, E., Bennett, K. L., Gerner, C. und Rossmannith, W.** (2008). RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell.* 135, 462-474.
88. **Houser-Scott, F., Xiao, S., Millikin, C. E., Zengel, J. M., Lindahl, L. und Engelke, D. R.** (2002). Interactions among the protein and RNA subunits of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2684-2689.
89. **Hsieh, J., Walker, S. C., Fierke, C. A. und Engelke, D. R.** (2009). Pre-tRNA turnover catalyzed by the yeast nuclear RNase P holoenzyme is limited by product release. *RNA.* 15, 224-234.
90. **Hua, Y. und Zhou, J.** (2004). Rpp20 interacts with SMN and is re-distributed into SMN granules in response to stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 268-276.
91. **Jacobson, M. R., Cao, L. G., Wang, Y. L. und Pederson, T.** (1995). Dynamic localization of RNase MRP RNA in the nucleolus observed by fluorescent RNA cytochemistry in living cells. *J. Cell Biol.* 131, 1649-1658.
92. **Jacobson, M. R., Cao, L. G., Taneja, K., Singer, R. H., Wang, Y. L. und Pederson, T.** (1997). Nuclear domains of the RNA subunit of RNase P. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 7), 829-837.
93. **Jarrous, N., Eder, P. S., Guerrier-Takada, C., Hoog, C. und Altman, S.** (1998). Autoantigenic properties of some protein subunits of catalytically active complexes of human ribonuclease P. *RNA.* 4, 407-417.
94. **Jarrous, N., Wolenski, J. S., Wesolowski, D., Lee, C. und Altman, S.** (1999). Localization in the nucleolus and coiled bodies of protein subunits of the ribonucleoprotein ribonuclease P. *J. Cell Biol.* 146, 559-572.
95. **Jarrous, N. und Altman, S.** (2001). Human ribonuclease P. *Methods Enzymol.* 342, 93-100.
96. **Jarrous, N., Reiner, R., Wesolowski, D., Mann, H., Guerrier-Takada, C. und Altman, S.** (2001). Function and subnuclear distribution of Rpp21, a protein subunit of the human ribonucleoprotein ribonuclease P. *RNA.* 7, 1153-1164.
97. **Jarrous, N. und Reiner, R.** (2007). Human RNase P: a tRNA-processing enzyme and transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 35, 3519-3524.

98. **Ji, G., Zheng, J., Shen, Y., Wu, X., Jiang, R., Lin, Y., Loke, J. C., Davis, K. M., Reese, G. J. und Li, Q. Q.** (2007). Predictive modeling of plant messenger RNA polyadenylation sites. *BMC. Bioinformatics.* 8, 43.
99. **Jiang, T., Guerrier-Takada, C. und Altman, S.** (2001). Protein-RNA interactions in the subunits of human nuclear RNase P. *RNA.* 7, 937-941.
100. **Jiang, T. und Altman, S.** (2001). Protein-protein interactions with subunits of human nuclear RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 920-925.
101. **Jiang, T. und Altman, S.** (2002). A protein subunit of human RNase P, Rpp14, and its interacting partner, OIP2, have 3'-->5' exoribonuclease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5295-5300.
102. **Jones-Rhoades, M. W., Borevitz, J. O. und Preuss, D.** (2007). Genome-wide expression profiling of the *Arabidopsis* female gametophyte identifies families of small, secreted proteins. *PLoS. Genet.* 3, 1848-1861.
103. **Kakuta, Y., Ishimatsu, I., Numata, T., Kimura, K., Yao, M., Tanaka, I. und Kimura, M.** (2005). Crystal structure of a ribonuclease P protein Ph1601p from *Pyrococcus horikoshii* OT3: an archaeal homologue of human nuclear ribonuclease P protein Rpp21. *Biochemistry.* 44, 12086-12093.
104. **Kalavrizioti, D., Vourekas, A. und Drainas, D.** (2007). DRpp20 and DRpp40: Two protein subunits involved in *Dictyostelium discoideum* ribonuclease P holoenzyme assembly. *Gene.* 400, 52-59.
105. **Kambach, C., Walke, S., Young, R., Avis, J. M., de la, F. E., Raker, V. A., Lührmann, R., Li, J. und Nagai, K.** (1999). Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell.* 96, 375-387.
106. **Karwan, R.** (1993). RNase MRP/RNase P: a structure-function relation conserved in evolution? *FEBS Lett.* 319, 1-4.
107. **Kassenbrock, C. K., Gao, G. J., Groom, K. R., Sulo, P., Douglas, M. G. und Martin, N. C.** (1995). RPM2, independently of its mitochondrial RNase P function, suppresses an ISP42 mutant defective in mitochondrial import and is essential for normal growth. *Mol. Cell Biol.* 15, 4763-4770.
108. **Kawano, S., Nakashima, T., Kakuta, Y., Tanaka, I. und Kimura, M.** (2006). Crystal structure of protein Ph1481p in complex with protein Ph1877p of archaeal RNase P from *Pyrococcus horikoshii* OT3: implication of dimer formation of the holoenzyme. *J. Mol. Biol.* 357, 583-591.
109. **Kazantsev, A. V., Krivenko, A. A., Harrington, D. J., Carter, R. J., Holbrook, S. R., Adams, P. D. und Pace, N. R.** (2003). High-resolution structure of RNase P protein from *Thermotoga maritima*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7497-7502.
110. **Kazantsev, A. V., Krivenko, A. A., Harrington, D. J., Holbrook, S. R., Adams, P. D. und Pace, N. R.** (2005). Crystal structure of a bacterial ribonuclease P RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13392-13397.

111. **Kikovska, E., Brännvall, M. und Kirsebom, L. A.** (2006). The exocyclic amine at the RNase P cleavage site contributes to substrate binding and catalysis. *J. Mol. Biol.* 359, 572-584.
112. **Kikovska, E., Svärd, S. G. und Kirsebom, L. A.** (2007). Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2062-2067.
113. **Kirsebom, L. A. und Svärd, S. G.** (1994). Base pairing between *Escherichia coli* RNase P RNA and its substrate. *EMBO J.* 13, 4870-4876.
114. **Kirsebom, L. A.** (2007). RNase P RNA mediated cleavage: Substrate recognition and catalysis. *Biochimie.* 89, 1183-1194.
115. **Kiss, T. und Filipowicz, W.** (1992). Evidence against a mitochondrial location of the 7-2/MRP RNA in mammalian cells. *Cell.* 70, 11-16.
116. **Kiss, T., Marshallsay, C. und Filipowicz, W.** (1992). 7-2/MRP RNAs in plant and mammalian cells: association with higher order structures in the nucleolus. *EMBO J.* 11, 3737-3746.
117. **Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. und Inokuchi, H.** (1994). A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9223-9227.
118. **Kouzuma, Y., Mizoguchi, M., Takagi, H., Fukuhara, H., Tsukamoto, M., Numata, T. und Kimura, M.** (2003). Reconstitution of archaeal ribonuclease P from RNA and four protein components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 666-673.
119. **Kovrigina, E., Wesolowski, D. und Altman, S.** (2003). Coordinate inhibition of expression of several genes for protein subunits of human nuclear RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1598-1602.
120. **Krasilnikov, A. S., Yang, X., Pan, T. und Mondragon, A.** (2003). Crystal structure of the specificity domain of ribonuclease P. *Nature.* 421, 760-764.
121. **Krasilnikov, A. S., Xiao, Y., Pan, T. und Mondragon, A.** (2004). Basis for structural diversity in homologous RNAs. *Science.* 306, 104-107.
122. **Krehan, M.** (2011). Überexpression und Aufreinigung des RNase P-Proteins ATrpp29 aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität Leipzig, Institut für Biochemie.
123. **Krupp, G., Cherayil, B., Frendewey, D., Nishikawa, S. und Söll, D.** (1986). Two RNA species co-purify with RNase P from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 5, 1697-1703.
124. **Kufel, J. und Kirsebom, L. A.** (1996). Different cleavage sites are aligned differently in the active site of M1 RNA, the catalytic subunit of *Escherichia coli* RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6085-6090.
125. **Kufel, J. und Kirsebom, L. A.** (1998). The P15-loop of *Escherichia coli* RNase P RNA is an autonomous divalent metal ion binding domain. *RNA.* 4, 777-788.

126. **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
127. **Lang, B. F., Burger, G., O'Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M. und Gray, M. W.** (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*. 387, 493-497.
128. **Lee, B., Matera, A. G., Ward, D. C. und Craft, J.** (1996). Association of RNase mitochondrial RNA processing enzyme with ribonuclease P in higher ordered structures in the nucleolus: a possible coordinate role in ribosome biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11471-11476.
129. **Lee, J. Y. und Engelke, D. R.** (1989). Partial characterization of an RNA component that copurifies with *Saccharomyces cerevisiae* RNase P. *Mol. Cell Biol.* 9, 2536-2543.
130. **Lee, J. Y., Rohlman, C. E., Molony, L. A. und Engelke, D. R.** (1991). Characterization of RPR1, an essential gene encoding the RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear RNase P. *Mol. Cell Biol.* 11, 721-730.
131. **Lee, J. Y., Evans, C. F. und Engelke, D. R.** (1991). Expression of RNase P RNA in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by an unusual RNA polymerase III promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 6986-6990.
132. **Lein, W., Usadel, B., Stitt, M., Reindl, A., Ehrhardt, T., Sonnewald, U. und Bornke, F.** (2008). Large-scale phenotyping of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) to identify essential leaf functions. *Plant Biotechnol. J.* 6, 246-263.
133. **Li, D., Willkomm, D. K., Schön, A. und Hartmann, R. K.** (2007). RNase P of the *Cyanophora paradoxa* cyanelle: a plastid ribozyme. *Biochimie*. 89, 1528-1538.
134. **Li, D., Willkomm, D. K. und Hartmann, R. K.** (2009). Minor changes largely restore catalytic activity of archaeal RNase P RNA from *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *Nucleic Acids Res.* 37, 231-242.
135. **Li, Q. und Hunt, A. G.** (1995). A near-upstream element in a plant polyadenylation signal consists of more than six nucleotides. *Plant Mol. Biol.* 28, 927-934.
136. **Li, Q. und Hunt, A. G.** (1997). The Polyadenylation of RNA in Plants. *Plant Physiol.* 115, 321-325.
137. **Li, X., Frank, D. N., Pace, N., Zengel, J. M. und Lindahl, L.** (2002). Phylogenetic analysis of the structure of RNase MRP RNA in yeasts. *RNA*. 8, 740-751.
138. **Li, Y. und Altman, S.** (2001). A subunit of human nuclear RNase P has ATPase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 441-444.
139. **Liu, F. und Altman, S.** (1994). Differential evolution of substrates for an RNA enzyme in the presence and absence of its protein cofactor. *Cell*. 77, 1093-1100.
140. **Logemann, J., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163, 16-20.

141. **Loke, J. C., Stahlberg, E. A., Strenski, D. G., Haas, B. J., Wood, P. C. und Li, Q. Q.** (2005). Compilation of mRNA polyadenylation signals in *Arabidopsis* revealed a new signal element and potential secondary structures. *Plant Physiol.* 138, 1457-1468.
142. **Lygerou, Z., Mitchell, P., Petfalski, E., Seraphin, B. und Tollervey, D.** (1994). The POP1 gene encodes a protein component common to the RNase MRP and RNase P ribonucleoproteins. *Genes Dev.* 8, 1423-1433.
143. **Lygerou, Z., Pluk, H., van Venrooij, W. J. und Seraphin, B.** (1996). hPop1: an autoantigenic protein subunit shared by the human RNase P and RNase MRP ribonucleoproteins. *EMBO J.* 15, 5936-5948.
144. **Lygerou, Z., Allmang, C., Tollervey, D. und Seraphin, B.** (1996). Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science.* 272, 268-270.
145. **Mann, H., Ben-Asouli, Y., Schein, A., Moussa, S. und Jarrous, N.** (2003). Eukaryotic RNase P: role of RNA and protein subunits of a primordial catalytic ribonucleoprotein in RNA-based catalysis. *Mol. Cell.* 12, 925-935.
146. **Marchfelder, A. und Brennicke, A.** (1994). Characterization and partial purification of tRNA processing activities from potato mitochondria. *Plant Physiol.* 105, 1247-1254.
147. **Marcu, K. und Dudock, B.** (1974). Characterization of a highly efficient protein synthesizing system derived from commercial wheat germ. *Nucleic Acids Res.* 1, 1385-1397.
148. **Marquez, S. M., Harris, J. K., Kelley, S. T., Brown, J. W., Dawson, S. C., Roberts, E. C. und Pace, N. R.** (2005). Structural implications of novel diversity in eucaryal RNase P RNA. *RNA.* 11, 739-751.
149. **Marquez, S. M., Chen, J. L., Evans, D. und Pace, N. R.** (2006). Structure and function of eukaryotic Ribonuclease P RNA. *Mol. Cell.* 24, 445-456.
150. **Martin, J., Gruber, M. und Lupas, A. N.** (2004). Coiled coils meet the chaperone world. *Trends Biochem. Sci.* 29, 455-458.
151. **Martin, N. C. und Underbrink-Lyon, K.** (1981). A mitochondrial locus is necessary for the synthesis of mitochondrial tRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4743-4747.
152. **Marvin, M. C. und Engelke, D. R.** (2009). RNase P: increased versatility through protein complexity? *RNA. Biol.* 6, 40-42.
153. **Meinkoth, J. und Wahl, G.** (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138, 267-284.
154. **Menzel, N.** (2002). Überexpression und Aufreinigung eines rekombinanten nukleären RNase P-Proteins aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Biochemie.
155. **Middelberg, A. P.** (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.* 20, 437-443.

156. **Miller, D. L. und Martin, N. C.** (1983). Characterization of the yeast mitochondrial locus necessary for tRNA biosynthesis: DNA sequence analysis and identification of a new transcript. *Cell*. 34, 911-917.
157. **Milligan, J. F. und Uhlenbeck, O. C.** (1989). Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* 180, 51-62.
158. **Mochida, K., Kawaura, K., Shimosaka, E., Kawakami, N., Shin, I., Kohara, Y., Yamazaki, Y. und Ogihara, Y.** (2006). Tissue expression map of a large number of expressed sequence tags and its application to in silico screening of stress response genes in common wheat. *Mol. Genet. Genomics.* 276, 304-312.
159. **Morales, M. J., Wise, C. A., Hollingsworth, M. J. und Martin, N. C.** (1989). Characterization of yeast mitochondrial RNase P: an intact RNA subunit is not essential for activity in vitro. *Nucleic Acids Res.* 17, 6865-6881.
160. **Morales, M. J., Dang, Y. L., Lou, Y. C., Sulo, P. und Martin, N. C.** (1992). A 105-kDa protein is required for yeast mitochondrial RNase P activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9875-9879.
161. **Mura, C., Cascio, D., Sawaya, M. R. und Eisenberg, D. S.** (2001). The crystal structure of a heptameric archaeal Sm protein: Implications for the eukaryotic snRNP core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5532-5537.
162. **Myslinski, E., Ame, J. C., Krol, A. und Carbon, P.** (2001). An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res.* 29, 2502-2509.
163. **Nass, A.** (1997). Spleißen und Modifizieren von tRNA^{Tyr}-Vorläufermolekülen in Pflanzen. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Biochemie.
164. **Newman, T., de Bruijn, F. J., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., McIntosh, L., Ohlrogge, J., Raikhel, N., Somerville, S. und Thomashow, M.** (1994). Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* 106, 1241-1255.
165. **Nieuwlandt, D. T., Haas, E. S. und Daniels, C. J.** (1991). The RNA component of RNase P from the archaebacterium *Haloferax volcanii*. *J. Biol. Chem.* 266, 5689-5695.
166. **Niranjanakumari, S., Stams, T., Crary, S. M., Christianson, D. W. und Fierke, C. A.** (1998). Protein component of the ribozyme ribonuclease P alters substrate recognition by directly contacting precursor tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15212-15217.
167. **Numata, T., Ishimatsu, I., Kakuta, Y., Tanaka, I. und Kimura, M.** (2004). Crystal structure of archaeal ribonuclease P protein Ph1771p from *Pyrococcus horikoshii* OT3: an archaeal homolog of eukaryotic ribonuclease P protein Rpp29. *RNA.* 10, 1423-1432.
168. **O'Connor, T. R., Dyreson, C. und Wyrick, J. J.** (2005). Athena: a resource for rapid visualization and systematic analysis of *Arabidopsis* promoter sequences. *Bioinformatics.* 21, 4411-4413.

-
169. **Oh, B. K. und Pace, N. R.** (1994). Interaction of the 3'-end of tRNA with ribonuclease P RNA. *Nucleic Acids Res.* 22, 4087-4094.
170. **Oh, B. K., Frank, D. N. und Pace, N. R.** (1998). Participation of the 3'-CCA of tRNA in the binding of catalytic Mg^{2+} ions by ribonuclease P. *Biochemistry.* 37, 7277-7283.
171. **Palaniswamy, S. K., James, S., Sun, H., Lamb, R. S., Davuluri, R. V. und Grotewold, E.** (2006). AGRIS and AtRegNet. a platform to link cis-regulatory elements and transcription factors into regulatory networks. *Plant Physiol.* 140, 818-829.
172. **Pan, T., Loria, A. und Zhong, K.** (1995). Probing of tertiary interactions in RNA: 2'-hydroxyl-base contacts between the RNase P RNA and pre-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 12510-12514.
173. **Pan, T. und Jakacka, M.** (1996). Multiple substrate binding sites in the ribozyme from *Bacillus subtilis* RNase P. *EMBO J.* 15, 2249-2255.
174. **Pannucci, J. A., Haas, E. S., Hall, T. A., Harris, J. K. und Brown, J. W.** (1999). RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7803-7808.
175. **Peck-Miller, K. A. und Altman, S.** (1991). Kinetics of the processing of the precursor to 4.5 S RNA, a naturally occurring substrate for RNase P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 221, 1-5.
176. **Perederina, A., Esakova, O., Koc, H., Schmitt, M. E. und Krasilnikov, A. S.** (2007). Specific binding of a Pop6/Pop7 heterodimer to the P3 stem of the yeast RNase MRP and RNase P RNAs. *RNA.* 13, 1648-1655.
177. **Perederina, A. und Krasilnikov, A. S.** (2010). The P3 domain of eukaryotic RNases P/MRP: Making a protein-rich RNA-based enzyme. *RNA. Biol.* 7.
178. **Perreault, J. P. und Altman, S.** (1992). Important 2'-hydroxyl groups in model substrates for M1 RNA, the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 226, 399-409.
179. **Perreault, J. P. und Altman, S.** (1993). Pathway of activation by magnesium ions of substrates for the catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 230, 750-756.
180. **Piccinelli, P., Rosenblad, M. A. und Samuelsson, T.** (2005). Identification and analysis of ribonuclease P and MRP RNA in a broad range of eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 33, 4485-4495.
181. **Pluk, H., van Eenennaam, H., Rutjes, S. A., Pruijn, G. J. und van Venrooij, W. J.** (1999). RNA-protein interactions in the human RNase MRP ribonucleoprotein complex. *RNA.* 5, 512-524.
182. **Pulukkunat, D. K. und Gopalan, V.** (2008). Studies on *Methanocaldococcus jannaschii* RNase P reveal insights into the roles of RNA and protein cofactors in RNase P catalysis. *Nucleic Acids Res.* 36, 4172-4180.

183. **Puranam, R. S. und Attardi, G.** (2001). The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol. Cell Biol.* 21, 548-561.
184. **Race, H. L., Herrmann, R. G. und Martin, W.** (1999). Why have organelles retained genomes? *Trends Genet.* 15, 364-370.
185. **Randau, L., Schröder, I. und Söll, D.** (2008). Life without RNase P. *Nature.* 453, 120-123.
186. **Reich, C., Olsen, G. J., Pace, B. und Pace, N. R.** (1988). Role of the protein moiety of ribonuclease P, a ribonucleoprotein enzyme. *Science.* 239, 178-181.
187. **Reiner, R., Ben-Asouli, Y., Krilovetzky, I. und Jarrous, N.** (2006). A role for the catalytic ribonucleoprotein RNase P in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* 20, 1621-1635.
188. **Reiner, R., Krasnov-Yoeli, N., Dehtiar, Y. und Jarrous, N.** (2008). Function and assembly of a chromatin-associated RNase P that is required for efficient transcription by RNA polymerase I. *PLoS. ONE.* 3, e4072.
189. **Reiner, R., fiya-Mor, N., Berrebi-Demma, M., Wesolowski, D., Altman, S. und Jarrous, N.** (2011). RNA binding properties of conserved protein subunits of human RNase P. *Nucleic Acids Res.*
190. **Reith, M. und Munholland, J.** (1995). Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Reporter.* 13, 333-335.
191. **Robertson, H. D., Altman, S. und Smith, J. D.** (1972). Purification and properties of a specific *Escherichia coli* ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid precursor. *J. Biol. Chem.* 247, 5243-5251.
192. **Roe, B. A.** (1975). Studies on human tRNA. I. The rapid, large scale isolation and partial fractionation of placenta and liver tRNA. *Nucleic Acids Res.* 2, 21-42.
193. **Rossmannith, W., Tullo, A., Potuschak, T., Karwan, R. und Sbisà, E.** (1995). Human mitochondrial tRNA processing. *J. Biol. Chem.* 270, 12885-12891.
194. **Rossmannith, W. und Karwan, R. M.** (1998). Characterization of human mitochondrial RNase P: novel aspects in tRNA processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 234-241.
195. **Rothnie, H. M.** (1996). Plant mRNA 3'-end formation. *Plant Mol. Biol.* 32, 43-61.
196. **Rothnie, H. M., Chen, G., Fütterer, J. und Hohn, T.** (2001). Polyadenylation in rice tungro bacilliform virus: cis-acting signals and regulation. *J. Virol.* 75, 4184-4194.
197. **Saghai-Marooif, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. und Allard, R. W.** (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 8014-8018.

198. **Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230, 1350-1354.
199. **Salavati, R., Panigrahi, A. K. und Stuart, K. D.** (2001). Mitochondrial ribonuclease P activity of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115, 109-117.
200. **Salinas, K., Wierzbicki, S., Zhou, L. und Schmitt, M. E.** (2005). Characterization and purification of *Saccharomyces cerevisiae* RNase MRP reveals a new unique protein component. *J. Biol. Chem.* 280, 11352-11360.
201. **Salinas, T., Duchene, A. M. und Marechal-Drouard, L.** (2008). Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem. Sci.* 33, 320-329.
202. **Sandman, K. und Reeve, J. N.** (2000). Structure and functional relationships of archaeal and eukaryal histones and nucleosomes. *Arch. Microbiol.* 173, 165-169.
203. **Sanger, F. und Coulson, A. R.** (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94, 441-448.
204. **Schedl, P. und Primakoff, P.** (1973). Mutants of *Escherichia coli* thermosensitive for the synthesis of transfer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 2091-2095.
205. **Schmitt, M. E. und Clayton, D. A.** (1994). Characterization of a unique protein component of yeast RNase MRP: an RNA-binding protein with a zinc-cluster domain. *Genes Dev.* 8, 2617-2628.
206. **Schön, A., Bock, A., Ott, G., Sprinzl, M. und Söll, D.** (1989). The selenocysteine-inserting opal suppressor serine tRNA from *E. coli* is highly unusual in structure and modification. *Nucleic Acids Res.* 17, 7159-7165.
207. **Schön, A.** (1995). Ribonuclease P from plant nuclei and photosynthetic organelles. *Mol. Biol. Rep.* 22, 139-145.
208. **Schön, A.** (1999). Ribonuclease P: the diversity of a ubiquitous RNA processing enzyme. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 391-406.
209. **Schumacher, M. A., Pearson, R. F., Möller, T., Valentin-Hansen, P. und Brennan, R. G.** (2002). Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J.* 21, 3546-3556.
210. **Seif, E., Cadieux, A. und Lang, B. F.** (2006). Hybrid *E. coli*--Mitochondrial ribonuclease P RNAs are catalytically active. *RNA*. 12, 1661-1670.
211. **Shahmuradov, I. A., Solovyev, V. V. und Gammernan, A. J.** (2005). Plant promoter prediction with confidence estimation. *Nucleic Acids Res.* 33, 1069-1076.
212. **Sharin, E., Schein, A., Mann, H., Ben-Asouli, Y. und Jarrous, N.** (2005). RNase P: role of distinct protein cofactors in tRNA substrate recognition and RNA-based catalysis. *Nucleic Acids Res.* 33, 5120-5132.
213. **Shu, H. H., Wise, C. A., Clark-Walker, G. D. und Martin, N. C.** (1991). A gene required for RNase P activity in *Candida (Torulopsis) glabrata* mitochondria codes

- for a 227-nucleotide RNA with homology to bacterial RNase P RNA. *Mol. Cell Biol.* 11, 1662-1667.
214. **Sidote, D. J., Heideker, J. und Hoffman, D. W.** (2004). Crystal structure of archaeal ribonuclease P protein aRpp29 from *Archaeoglobus fulgidus*. *Biochemistry.* 43, 14128-14138.
215. **Siegel, R. W., Banta, A. B., Haas, E. S., Brown, J. W. und Pace, N. R.** (1996). *Mycoplasma fermentans* simplifies our view of the catalytic core of ribonuclease P RNA. *RNA.* 2, 452-462.
216. **Siew, D., Zahler, N. H., Cassano, A. G., Strobel, S. A. und Harris, M. E.** (1999). Identification of adenosine functional groups involved in substrate binding by the ribonuclease P ribozyme. *Biochemistry.* 38, 1873-1883.
217. **Simanis, V. und Lane, D. P.** (1985). An immunoaffinity purification procedure for SV40 large T antigen. *Virology.* 144, 88-100.
218. **Smith, D., Burgin, A. B., Haas, E. S. und Pace, N. R.** (1992). Influence of metal ions on the ribonuclease P reaction. Distinguishing substrate binding from catalysis. *J. Biol. Chem.* 267, 2429-2436.
219. **Smith, D. und Pace, N. R.** (1993). Multiple magnesium ions in the ribonuclease P reaction mechanism. *Biochemistry.* 32, 5273-5281.
220. **Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
221. **Spitzfaden, C., Nicholson, N., Jones, J. J., Guth, S., Lehr, R., Prescott, C. D., Hegg, L. A. und Eggleston, D. S.** (2000). The structure of ribonuclease P protein from *Staphylococcus aureus* reveals a unique binding site for single-stranded RNA. *J. Mol. Biol.* 295, 105-115.
222. **Sprinzel, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A. und Steinberg, S.** (1998). Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 26, 148-153.
223. **Srisawat, C., Houser-Scott, F., Bertrand, E., Xiao, S., Singer, R. H. und Engelke, D. R.** (2002). An active precursor in assembly of yeast nuclear ribonuclease P. *RNA.* 8, 1348-1360.
224. **Stams, T., Niranjanakumari, S., Fierke, C. A. und Christianson, D. W.** (1998). Ribonuclease P protein structure: evolutionary origins in the translational apparatus. *Science.* 280, 752-755.
225. **Stange, N. und Beier, H.** (1987). A cell-free plant extract for accurate pre-tRNA processing, splicing and modification. *EMBO J.* 6, 2811-2818.
226. **Stark, B. C., Kole, R., Bowman, E. J. und Altman, S.** (1978). Ribonuclease P: an enzyme with an essential RNA component. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 3717-3721.

-
227. **Stathopoulos, C., Kalpaxis, D. L. und Drainas, D.** (1995). Partial purification and characterization of RNase P from *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* 228, 976-980.
228. **Steitz, T. A. und Steitz, J. A.** (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 6498-6502.
229. **Stellwagen, N. C., Bossi, A., Gelfi, C. und Righetti, P. G.** (2000). DNA and buffers: are there any noninteracting, neutral pH buffers? *Anal. Biochem.* 287, 167-175.
230. **Stellwagen, N. C., Gelfi, C. und Righetti, P. G.** (2000). DNA and buffers: the hidden danger of complex formation. *Biopolymers.* 54, 137-142.
231. **Stribinskis, V., Gao, G. J., Sulo, P., Dang, Y. L. und Martin, N. C.** (1996). Yeast mitochondrial RNase P RNA synthesis is altered in an RNase P protein subunit mutant: insights into the biogenesis of a mitochondrial RNA-processing enzyme. *Mol. Cell Biol.* 16, 3429-3436.
232. **Stribinskis, V., Gao, G. J., Sulo, P., Ellis, S. R. und Martin, N. C.** (2001). Rpm2p: separate domains promote tRNA and Rpm1r maturation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 29, 3631-3637.
233. **Stribinskis, V., Gao, G. J., Ellis, S. R. und Martin, N. C.** (2001). Rpm2, the protein subunit of mitochondrial RNase P in *Saccharomyces cerevisiae*, also has a role in the translation of mitochondrially encoded subunits of cytochrome c oxidase. *Genetics.* 158, 573-585.
234. **Stribinskis, V., Heyman, H. C., Ellis, S. R., Steffen, M. C. und Martin, N. C.** (2005). Rpm2p, a component of yeast mitochondrial RNase P, acts as a transcriptional activator in the nucleus. *Mol. Cell Biol.* 25, 6546-6558.
235. **Stribinskis, V. und Ramos, K. S.** (2007). Rpm2p, a protein subunit of mitochondrial RNase P, physically and genetically interacts with cytoplasmic processing bodies. *Nucleic Acids Res.* 35, 1301-1311.
236. **Sun, L., Campbell, F. E., Zahler, N. H. und Harris, M. E.** (2006). Evidence that substrate-specific effects of C5 protein lead to uniformity in binding and catalysis by RNase P. *EMBO J.* 25, 3998-4007.
237. **Sun, L. und Harris, M. E.** (2007). Evidence that binding of C5 protein to P RNA enhances ribozyme catalysis by influencing active site metal ion affinity. *RNA.* 13, 1505-1515.
238. **Svård, S. G., Kagardt, U. und Kirsebom, L. A.** (1996). Phylogenetic comparative mutational analysis of the base-pairing between RNase P RNA and its substrate. *RNA.* 2, 463-472.
239. **Takagi, H., Watanabe, M., Kakuta, Y., Kamachi, R., Numata, T., Tanaka, I. und Kimura, M.** (2004). Crystal structure of the ribonuclease P protein Ph1877p from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 787-794.

240. **Tallsjö, A. und Kirsebom, L. A.** (1993). Product release is a rate-limiting step during cleavage by the catalytic RNA subunit of *Escherichia coli* RNase P. *Nucleic Acids Res.* 21, 51-57.
241. **Teakle, G. R., Manfield, I. W., Graham, J. F. und Gilmartin, P. M.** (2002). *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Mol. Biol.* 50, 43-57.
242. **Thiel, C. T., Horn, D., Zabel, B., Ekici, A. B., Salinas, K., Gebhart, E., Ruschendorf, F., Sticht, H., Spranger, J., Muller, D., Zweier, C., Schmitt, M. E., Reis, A. und Rauch, A.** (2005). Severely incapacitating mutations in patients with extreme short stature identify RNA-processing endoribonuclease RMRP as an essential cell growth regulator. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 795-806.
243. **Thomas, B. C., Gao, L., Stomp, D., Li, X. und Gegenheimer, P. A.** (1995). Spinach chloroplast RNase P: a putative protein enzyme. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 95-98.
244. **Thomas, B. C., Li, X. und Gegenheimer, P.** (2000). Chloroplast ribonuclease P does not utilize the ribozyme-type pre-tRNA cleavage mechanism. *RNA.* 6, 545-553.
245. **Topper, J. N. und Clayton, D. A.** (1990). Secondary structure of the RNA component of a nuclear/mitochondrial ribonucleoprotein. *J. Biol. Chem.* 265, 13254-13262.
246. **Torres-Larios, A., Swinger, K. K., Krasilnikov, A. S., Pan, T. und Mondragon, A.** (2005). Crystal structure of the RNA component of bacterial ribonuclease P. *Nature.* 437, 584-587.
247. **Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350-4354.
248. **Tranguch, A. J., Kindelberger, D. W., Rohlman, C. E., Lee, J. Y. und Engelke, D. R.** (1994). Structure-sensitive RNA footprinting of yeast nuclear ribonuclease P. *Biochemistry.* 33, 1778-1787.
249. **Tremousaygue, D., Manevski, A., Bardet, C., Lescure, N. und Lescure, B.** (1999). Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems. *Plant J.* 20, 553-561.
250. **True, H. L. und Celandier, D. W.** (1998). Protein components contribute to active site architecture for eukaryotic ribonuclease P. *J. Biol. Chem.* 273, 7193-7196.
251. **Turmel, M., Otis, C. und Lemieux, C.** (1999). The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10248-10253.
252. **Underbrink-Lyon, K., Miller, D. L., Ross, N. A., Fukuhara, H. und Martin, N. C.** (1983). Characterization of a yeast mitochondrial locus necessary for tRNA biosynthesis. Deletion mapping and restriction mapping studies. *Mol. Gen. Genet.* 191, 512-518.

253. **van Eenennaam, H., Pruijn, G. J. und van Venrooij, W. J.** (1999). hPop4: a new protein subunit of the human RNase MRP and RNase P ribonucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Res.* 27, 2465-2472.
254. **van Eenennaam, H., van der Heijden, A., Janssen, R. J., van Venrooij, W. J. und Pruijn, G. J.** (2001). Basic domains target protein subunits of the RNase MRP complex to the nucleolus independently of complex association. *Mol. Biol. Cell.* 12, 3680-3689.
255. **van Eenennaam, H., Lugtenberg, D., Vogelzangs, J. H., van Venrooij, W. J. und Pruijn, G. J.** (2001). hPop5, a protein subunit of the human RNase MRP and RNase P endoribonucleases. *J. Biol. Chem.* 276, 31635-31641.
256. **van Eenennaam, H., Vogelzangs, J. H., Lugtenberg, D., Van Den Hoogen, F. H., van Venrooij, W. J. und Pruijn, G. J.** (2002). Identity of the RNase MRP- and RNase P-associated Th/To autoantigen. *Arthritis Rheum.* 46, 3266-3272.
257. **Vourekas, A., Kalavrizioti, D., Zarkadis, I. K., Spyroulias, G. A., Stathopoulos, C. und Drainas, D.** (2007). A 40.7 kDa Rpp30/Rpp1 homologue is a protein subunit of *Dictyostelium discoideum* RNase P holoenzyme. *Biochimie.* 89, 301-310.
258. **Walker, S. C. und Engelke, D. R.** (2006). Ribonuclease p: the evolution of an ancient RNA enzyme. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 77-102.
259. **Walker, S. C. und Engelke, D. R.** (2008). A protein-only RNase P in human mitochondria. *Cell.* 135, 412-414.
260. **Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T. und Itakura, K.** (1979). Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.* 6, 3543-3557.
261. **Wang, M. J., Davis, N. W. und Gegenheimer, P.** (1988). Novel mechanisms for maturation of chloroplast transfer RNA precursors. *EMBO J.* 7, 1567-1574.
262. **Warnecke, J. M., Fürste, J. P., Hardt, W. D., Erdmann, V. A. und Hartmann, R. K.** (1996). Ribonuclease P (RNase P) RNA is converted to a Cd²⁺-ribozyme by a single Rp-phosphorothioate modification in the precursor tRNA at the RNase P cleavage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8924-8928.
263. **Warnecke, J. M., Held, R., Busch, S. und Hartmann, R. K.** (1999). Role of metal ions in the hydrolysis reaction catalyzed by RNase P RNA from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 290, 433-445.
264. **Weber, A. P., Weber, K. L., Carr, K., Wilkerson, C. und Ohlrogge, J. B.** (2007). Sampling the *Arabidopsis* transcriptome with massively parallel pyrosequencing. *Plant Physiol.* 144, 32-42.
265. **Wegscheid, B. und Hartmann, R. K.** (2006). The precursor tRNA 3'-CCA interaction with *Escherichia coli* RNase P RNA is essential for catalysis by RNase P *in vivo*. *RNA.* 12, 2135-2148.
266. **Wegscheid, B. und Hartmann, R. K.** (2007). *In vivo* and *in vitro* investigation of bacterial type B RNase P interaction with tRNA 3'-CCA. *Nucleic Acids Res.* 35, 2060-2073.

267. **Welting, T. J., van Venrooij, W. J. und Pruijn, G. J.** (2004). Mutual interactions between subunits of the human RNase MRP ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res.* 32, 2138-2146.
268. **Welting, T. J., Kikkert, B. J., van Venrooij, W. J. und Pruijn, G. J.** (2006). Differential association of protein subunits with the human RNase MRP and RNase P complexes. *RNA.* 12, 1373-1382.
269. **Welting, T. J., Peters, F. M., Hensen, S. M., van Doorn, N. L., Kikkert, B. J., Raats, J. M., van Venrooij, W. J. und Pruijn, G. J.** (2007). Heterodimerization regulates RNase MRP/RNase P association, localization, and expression of Rpp20 and Rpp25. *RNA.* 13, 65-75.
270. **White, J. A., Todd, J., Newman, T., Focks, N., Girke, T., de Ilarduya, O. M., Jaworski, J. G., Ohlrogge, J. B. und Benning, C.** (2000). A new set of *Arabidopsis* expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiol.* 124, 1582-1594.
271. **Will, C. L., Marakov, E. M., Marakova, O. V., and Lührmann, R.** Immunoaffinity Purification of Spliceosomal and Small Nuclear Ribonucleoprotein Complexes. Hartmann, R. K., Bindereif, A., Schön, A., and Westhof, E. Handbook of RNA Biochemistry. 1st[42]. 2005. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
272. **Wise, C. A. und Martin, N. C.** (1991). Dramatic size variation of yeast mitochondrial RNAs suggests that RNase P RNAs can be quite small. *J. Biol. Chem.* 266, 19154-19157.
273. **Woodhams, M. D., Stadler, P. F., Penny, D. und Collins, L. J.** (2007). RNase MRP and the RNA processing cascade in the eukaryotic ancestor. *BMC. Evol. Biol.* 7 Suppl 1, S13.
274. **Wu, Q. und Krainer, A. R.** (1999). AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conservation of minor introns in voltage-gated ion channel genes. *Mol. Cell Biol.* 19, 3225-3236.
275. **Xiao, S., Scott, F., Fierke, C. A. und Engelke, D. R.** (2002). Eukaryotic ribonuclease P: a plurality of ribonucleoprotein enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 165-189.
276. **Xiao, S., Day-Storms, J. J., Srisawat, C., Fierke, C. A. und Engelke, D. R.** (2005). Characterization of conserved sequence elements in eukaryotic RNase P RNA reveals roles in holoenzyme assembly and tRNA processing. *RNA.* 11, 885-896.
277. **Xiao, S., Hsieh, J., Nugent, R. L., Coughlin, D. J., Fierke, C. A. und Engelke, D. R.** (2006). Functional characterization of the conserved amino acids in Pop1p, the largest common protein subunit of yeast RNases P and MRP. *RNA.* 12, 1023-1037.
278. **Xiao, Y. L., Smith, S. R., Ishmael, N., Redman, J. C., Kumar, N., Monaghan, E. L., Ayele, M., Haas, B. J., Wu, H. C. und Town, C. D.** (2005). Analysis of the cDNAs of hypothetical genes on *Arabidopsis* chromosome 2 reveals numerous transcript variants. *Plant Physiol.* 139, 1323-1337.
279. **Yen, Y. und Green, P. J.** (1991). Identification and Properties of the Major Ribonucleases of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology.* 97, 1487-1493.

- 280. **Zahler, N. H., Christian, E. L. und Harris, M. E.** (2003). Recognition of the 5' leader of pre-tRNA substrates by the active site of ribonuclease P. *RNA*. 9, 734-745.
- 281. **Zhang, H. und Altman, S.** (2004). Inhibition of the expression of the human RNase P protein subunits Rpp21, Rpp25, Rpp29 by external guide sequences (EGSs) and siRNA. *J. Mol. Biol.* 342, 1077-1083.
- 282. **Zhu, Y., Stribinskis, V., Ramos, K. S. und Li, Y.** (2006). Sequence analysis of RNase MRP RNA reveals its origination from eukaryotic RNase P RNA. *RNA*. 12, 699-706.
- 283. **Ziehler, W. A., Morris, J., Scott, F. H., Millikin, C. und Engelke, D. R.** (2001). An essential protein-binding domain of nuclear RNase P RNA. *RNA*. 7, 565-575.
- 284. **Zuker, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406-3415.

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Sekundärstrukturdarstellung der Typ A bzw. Typ B RNase P RNAs	17
Abb. 2:	Raumstrukturmodelle der RNase P RNAs aus <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	18
Abb. 3:	Struktur des RNase P Proteins in <i>Bacillus subtilis</i>	19
Abb. 4:	Mechanismus der RNase P-Reaktion	20
Abb. 5:	Substraterkennung durch RNase P RNA	22
Abb. 6:	Sekundärstrukturen archaebakterieller RNase P RNAs	23
Abb. 7:	Raumstrukturmodelle von RNase P Proteinen aus <i>Pyrococcus horikoshii</i>	24
Abb. 8:	Raumstrukturmodelle von RNase P Proteinen aus <i>Pyrococcus horikoshii</i>	25
Abb. 9:	Beispiele von Sekundärstrukturen eukaryotischer nukleärer RNase P RNAs	30
Abb. 10:	Übersicht der Protein-Protein-Interaktionen der RNase P/MRP Proteine in Hefe und Mensch	32
Abb. 11:	Beispiele von Sekundärstrukturen eukaryotischer nukleärer RNase MRP RNAs ..	40
Abb. 12:	pCRII-TOPO	44
Abb. 13:	pCR-XL-TOPO	45
Abb. 14:	pUC19	45
Abb. 15:	pRSET-A	45
Abb. 16:	Aufbau des Kapillarblots nach Southern	69
Abb. 17:	Aufbau eines Tank-Blot Sandwiches für die Trans Blot Mini Cell	70
Abb. 18:	Schema der 3'-RACE-PCR, Sequenzen sind beispielhaft	74
Abb. 19:	Aufbau des Western Blot-Stapels	91
Abb. 20:	Sequenzalignment der MRP-Varianten und der zur Analyse verwendeten Primer	102
Abb. 21:	Nachweis von MRP RNAs durch RT-PCR und Identitätskontrolle durch Restriktionshydrolyse mit EcoRV	103
Abb. 22:	Semiquantitative Bestimmung der Mengenverhältnisse von MRPR1 und MRPR2	104
Abb. 23:	Northern Blot Analyse von RNase P/MRP RNAs aus <i>A. thaliana</i> und Weizenkeim	105
Abb. 24:	Upstream-Region und Transkriptionsstart der RNase P/MRP RNAs in <i>Arabidopsis thaliana</i>	106
Abb. 25:	Test auf Ribozymreaktion der MRP RNAs	107
Abb. 26:	Spleißvarianten der AtPOP1-mRNA	108
Abb. 27:	Ermittlung der Polyadenylierungsstelle von AtPOP1	109
Abb. 28:	Transkriptionsinitiationsstelle von AtPOP1-mRNA	110
Abb. 29:	Northern Blot Analyse der AtPOP1-mRNA	111
Abb. 30:	Spleißschema der AtRpp30-mRNAs	114
Abb. 31:	Transkriptionsinitiations- und Polyadenylierungsstellen der AtRpp30-mRNAs ..	116
Abb. 32:	Sequenzalignment von AtRpp30p mit bekannten Rpp30-Homologen	118
Abb. 33:	Spleißschema der AtRpp38-mRNA	119
Abb. 34:	Polyadenylierungsstellen von AtRpp38	120
Abb. 35:	Spleißvarianten der AtRpp29-mRNA	121
Abb. 36:	Polyadenylierungsstellen von AtRpp29	122
Abb. 37:	Northern Blot Analyse der AtRpp29-mRNA	123
Abb. 38:	Elutionsprofil der Affinitätschromatografie von rekombinantem AtPOP1p	124
Abb. 39:	SDS-PAGE der Fraktionen der Affinitätsreinigung von ATPOP1p	125
Abb. 40:	Elutionsprofil der Affinitätschromatografie von AtRpp30-0p	126
Abb. 41:	SDS-PAGE der Fraktionen der Affinitätsreinigung von AtRpp30-0p	126
Abb. 42:	Dot-Blot von AtRpp30p	127

Abb. 43:	Elutionsprofil der Affinitätschromatografie von rekombinantem AtRpp38p.....	128
Abb. 44:	SDS-PAGE der Fraktionen der Affinitätsreinigung von AtRpp38p.....	128
Abb. 45:	Analyse des Laufverhaltens der MRPR1 im nativen PAA-Gel.....	129
Abb. 46:	Analyse des Laufverhaltens der MRPR1/S-Domäne im nativen PAA-Gel.....	130
Abb. 47:	Komplexbildung aus AtPOP1p und MRPR1 unter verschiedenen Reaktionsbedingungen	132
Abb. 48:	Spezifität der Bindung von AtPOP1p an MRPR1	133
Abb. 49:	Direkte Auftragung der Bindung von MRPR1 an AtPOP1p	133
Abb. 50:	Doppelt-reziproke Auftragung der Bindung von MRPR1 an AtPOP1p.....	134
Abb. 51:	Lineare Darstellung der Bindungswerte der POP1p-MRPR1-Komplexe nach Scatchard	135
Abb. 52:	Lineare Darstellung der Bindungswerte nach Hanes	135
Abb. 53:	Bindung von AtPOP1p an MRPR-Varianten und pre-tRNA ^{Tyr}	136
Abb. 54:	Einfluss des RNase P-Substrats auf die Komplexbildung von AtPOP1p mit MRPR1	137
Abb. 55:	Komplexbildung zwischen AtPOP1p bzw. AtRpp38p und MRPR1	137
Abb. 56:	Abhängigkeit der Bindung zwischen AtRpp38p und MRPR1 von Triton X-100, Glycerin und Salzbedingungen	138
Abb. 57:	Bindung von AtRpp38p und MRPR1	139
Abb. 58:	Direkte Auftragung der Komplexbildung aus MRPR1 und AtRpp38p.....	140
Abb. 59:	Doppelt-reziproke Auftragung der Bindung von MRPR1 an AtRpp38p nach Klotz	140
Abb. 60:	Lineare Darstellung der Bindung von MRPR1 an AtRpp38p nach Scatchard	141
Abb. 61:	Lineare Darstellung der Bindungswerte von MRPR1 an AtRpp38p nach Hanes	142
Abb. 62:	Komplexbildung von AtRpp38p mit MRPR-Varianten sowie pre-tRNA ^{Tyr}	143
Abb. 63:	Bindungsverhalten von AtRpp38p und MRPR1 in Gegenwart von pre-tRNA ^{Tyr}	144
Abb. 64:	Komplexbildung von AtRpp30p mit MRPR-Varianten	145
Abb. 65:	Komplexbildung von AtRpp14p mit MRPR-Varianten	146
Abb. 66:	Kombinierte Bindung von AtRpp38p, AtPOP1p und MRPR1	147
Abb. 67:	Dot-Blot von AtPOP1p	149
Abb. 68:	Western Blot Analyse verschiedener Zellextrakte mit AtPOP1p-AK	150
Abb. 69:	Western Blot Analyse von Blumenkohl-Extrakt mit AtPOP1p-spezifischen Antikörpern	150
Abb. 70:	Nachweis von POP1p-Homologen in verschiedenen Pflanzenextrakten durch Western Blot	151
Abb. 71:	Nachweis von POP1-Homologen in präzipitiertem A. thaliana-Proteinextrakt	152
Abb. 72:	Nachweis von Rpp30p-Homologen in verschiedenen Pflanzenextrakten durch Western Blot	153
Abb. 73:	Detektion von Rpp38p-Homologen in Pflanzenextrakten durch Western Blot.....	154
Abb. 74:	Nachweis von Rpp29p-Homologen in pflanzlichen Proteinextrakten durch Western Blot	155
Abb. 75:	Amplifikation von homologen RNase MRP RNA-Sequenzen aus genomischer DNA verschiedener Pflanzen.....	156
Abb. 76:	Sekundärstrukturen der A. thaliana RNase MRP RNAs.....	157
Abb. 77:	Vergleich der Weizen MRP-Sequenzen	158
Abb. 78:	Sekundärstruktur der identifizierten MRP RNA aus Weizen	159
Abb. 79:	Amplifikation von TaMRP-cDNA aus gereinigter RNase P	160
Abb. 80:	Immunopräzipitation der RNase P-Aktivität aus Weizenkeimextrakt mit AtPOP1p-bzw. AtRpp30p-spezifischen Antikörpern	161
Abb. 81:	Immunopräzipitation der RNase P-Aktivität aus Weizenkeimextrakt mit AtRpp38p-spezifischen Antikörpern	162

Abb. 82: Identifikation von Weizen-RNase MRP RNA in AtPOP1p-spezifischem Immunopräzipitat	162
Abb. 83: Alignment der universal konservierten Regionen von RNase P-RNAs	165
Abb. 84: Struktur der <i>A. thaliana</i> RNase MRP RNAs	168
Abb. 85: Sekundärstrukturen der klonierten MRP-Varianten aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	216
Abb. 86: Alignment der AtPOP1-Spleißvarianten mit der Chromosomalen Region.....	226
Abb. 87: Vergleich der Proteinsequenzen von AtPOP1p-Varianten und POP1p-Homologen anderer Organismen	233
Abb. 88: Alignment der AtRpp30-Spleißvarianten mit der Chromosomalen Region	240
Abb. 89: Alignment von AtRpp30p-Varianten mit Rpp30p-Homologen anderer Organismen.....	243
Abb. 90: Alignment der AtRpp38-Spleißvarianten mit der Chromosomalen Region	249
Abb. 91: Alignment der AtRpp29-Spleißvariante mit der Chromosomalen Region	255
Abb. 92: Vergleich der Proteinsequenzen von AtRpp29p und Rpp29p-Homologen aus anderen Organismen.....	258

11. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der RNase P/MRP aus Hefe, Mensch und Archaea	28
Tab. 2: RNA-Bindungspartner der RNase P Proteine	33
Tab. 3: Zusammenfassung der hergestellten <i>A. thaliana</i> RNase MRP RNA-Transkripte....	101
Tab. 4: Vergleich der konservierten Regionen von hPOP1p und AtPOP1p	112
Tab. 5: Übersicht der identifizierten RNAs mit der Zahl zugehöriger Fragmente.....	163
Tab. 6: Analyse der Proteinsequenzen von AtRpp30p.....	244
Tab. 7: Messwerte für die AtPOP1p-AtMRP RNA1-Komplexbildung - Teil 1	259
Tab. 8: Messwerte für die AtPOP1p-AtMRP RNA1-Komplexbildung - Teil 2	260
Tab. 9: Messwerte für die AtRpp38p-AtMRP RNA1-Komplexbildung - Teil 1	261
Tab. 10: Messwerte für die AtRpp38p-AtMRP RNA1-Komplexbildung - Teil 2.....	262
Tab. 11: Messwerte für die AtRpp38p-AtMRP RNA1-Komplexbildung - Teil 3	263
Tab. 12: Messwerte für die AtRpp38p-AtMRP RNA1-Komplexbildung - Teil 4.....	264
Tab. 13: Spezifität der verwendeten Seren vor und nach der Vorbehandlung	265

12. Anhang

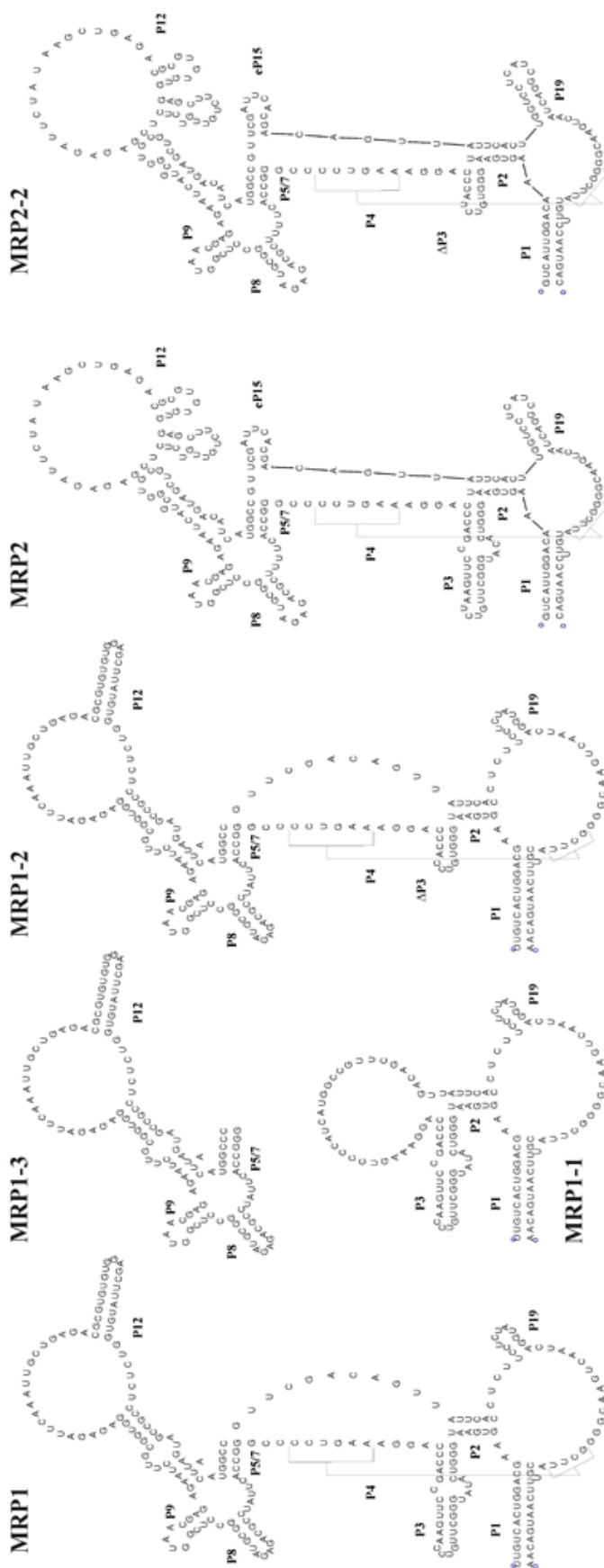


Abb. 85: Sekundärstrukturen der klonierten MRP-Varianten aus *Arabidopsis thaliana*

Die Sekundärstrukturen wurden mit Mfold V3.2 berechnet und mit RNAviz dargestellt. Alle Varianten enthalten als *in vitro*-Transkript drei Guanosine und ein terminales Triphosphat am 5'-Ende. Die Darstellung der P12 weicht von der in Abb. 76 ab und berücksichtigt die in RNase P konservierten Elemente CR11 und CR13 (siehe auch Abb. 84).

Alignment der *POPI* mRNAs:

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																								
Spleißmuster	-----Promotor-Region-----																																
At Chr 2	CCA	TTGAGGG	TGGGCC	TTAA	CAAA	TTCT	ATTT	GACAAA	TTTGA	TATGGGC	TAGAA	CCCCCA	TTAAG	TAAA	CC	TTTT	TA	TTA	TTGAGAA	GTAAGAAAA	100													
Promotor	-----	CAA	TTCT	ATTT	GACAAA	TTTGA	TATGGGC	TAGAA	CCCCCA	TTAAG	TAAA	CC	TTTT	TA	TTA	TTGAGAA	GTAAGAAAA	80																
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																								
Spleißmuster	-----Promotor-Region-----																																
At Chr 2	CCCA	TTAAG	TAGAC	CTTT	ATA	TAGGCC	CA	TTAA	CT	CA	TTAG	TTGAG	CAAA	TAC	TG	TAAA	TATAGGCC	CCCC	TTTT	GT	CT	CT	CAA	200										
Promotor	CCCA	TTAAG	TAGAC	CTTT	ATA	TAGGCC	CA	TTAA	CT	CA	TTAG	TTGAG	CAAA	TAC	TG	TAAA	TATAGGCC	CCCC	TTTT	GT	CT	CT	CAA	180										
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																								
Spleißmuster	-----5'-UTR-----																																
At Chr 2	AG	TACACCA	TAA	GTAAAA	AAAA	AAAA	AAAA	CA	TGCG	TA	TAGAA	TCG	AAAA	CC	TTAA	TTTT	CT	GAT	TTAC	AAAA	TTCCG	ACCA	AAA	TC	CT	GT	TTCC	CT	300					
Promotor	AG	TACACCA	TAA	GTAAAA	AAAA	AAAA	AAAA	CA	TGCG	TA	TAGAA	TCG	AAAA	CC	TTAA	TTTT	CT	GAT	TTAC	AAAA	TTCCG	ACCA	AAA	TC	CT	GT	TTCC	CT	280					
DQ069804	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	38						
DQ069805	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	62						
AtPOP1-RACE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	73						
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400																								
Spleißmuster	-----5'-UTR-----																																
At Chr 2	CT	TTA	TC	CC	TT	GT	TC	GT	AC	TGA	TTCT	CTA	AG	CCG	TG	AC	GG	TG	CC	AG	TG	CT	CT	CT	TT	TA	TAC	AT	TC	GT	GC	CC	GC	400
Promotor	CT	TTA	TC	CC	TT	GT	TC	GT	AC	TGA	TTCT	CTA	AG	CCG	TG	AC	GG	TG	CC	AG	TG	CT	CT	CT	TT	TA	TAC	AT	TC	GT	GC	CC	GC	380
DQ069804	CT	TTA	TC	CC	TT	GT	TC	GT	AC	TGA	TTCT	CTA	AG	CCG	TG	AC	GG	TG	CC	AG	TG	CT	CT	CT	TT	TA	TAC	AT	TC	GT	GC	CC	GC	138
DQ069805	CT	TTA	TC	CC	TT	GT	TC	GT	AC	TGA	TTCT	CTA	AG	CCG	TG	AC	GG	TG	CC	AG	TG	CT	CT	CT	TT	TA	TAC	AT	TC	GT	GC	CC	GC	162
AtPOP1-RACE	CT	TTA	TC	CC	TT	GT	TC	GT	AC	TGA	TTCT	CTA	AG	CCG	TG	AC	GG	TG	CC	AG	TG	CT	CT	CT	TT	TA	TAC	AT	TC	GT	GC	CC	GC	173

[illegible]

Spleißmuster

AtPOP1-1, S

ATPOPI-RACE

Spleißmuster

At Chr 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
84

AtPOP1-1, us

Spleißmuster

1000

DO069804

AtPOP1-1, S

AtPOP1-1. us

AtPOP1-RACE

[illegible]

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
Spleißmuster									
At Chr 2	-----IntronIII-----									
DQ069804	TAGAA TGA T TA ACCGCAAG TTGTTTCTTCAGCTTTATCA T GC AA CC AC AGTTTCTCAGGCGATTGCTCC T GT ACT TA T AT GTGGAGAC CT									1500
DQ069805	-----C TTT TA TCA T GC AA CC AC AGTTTCTCAGGCGATTGCTCC T GT ACT TA T AT GTGGAGAC CT									958
AtPOP1-RACE	-----C TTT TA TCA T GC AA CC AC AGTTTCTCAGGCGATTGCTCC T GT ACT TA T AT GTGGAGAC CT									984
	-----C TTT TA TCA T GC AA CC AC AGTTTCTCAGGCGATTGCTCC T GT ACT TA T AT GTGGAGAC CT									993
									
Spleißmuster	-----ExonIV-----									
At Chr 2	T CT AA GA T AC CA AA GAGAA GA AA TGAGGAGAAAGGGGGTGACGGCA TAG GA AC TGA T CT CC AG T CT CAGAT AA AG TCA TGAAGAC TTT CGTAA AC CT TT									1600
DQ069804	T CT AA GA T AC CA AA GAGAA GA AA TGAGGAGAAAGGGGGTGACGGCA TAG GA AC CTGA T CT CC AG T CT CAGAT AA AG TCA TGAAGAC TTT CGTAA AC CT TT									1058
DQ069805	T CT AA GA T NC CA AA GAGAA GA AA TGAGGAGAAAGGGGGTGRCGGCA TAG GA AC CTGA T CT CC AG T CT CAGAT AA AG TCA TGAAGAC TTT CGTAA AC CT TT									1084
AtPOP1-RACE	T CT AA GA T AC CA AA GAGAA GA AA TGAGGAGAAAGGGGGTGACGGCA TAG GA AC CTGA T CT CC AG T CT CAGAT AA AG TCA TGAAGAC TTT CGTAA AC CT TT									1093
									
Spleißmuster	-----ExonIV-----									
At Chr 2	GGG GT GGAT CC AT GC TT CT CC TT CC TT CAGTGAAG GA T AT GC TA T CT TA AG TAG CT TT GT CA GA AA AC AG GTAG CT AT TT GT GT CT TT TT GAGG TT AT TTTT TT									1700
DQ069804	GGG GT GGAT CC AT GC TT CT CC TT CC TT CAGTGAAG GA T AT GC TA T CT TA AG TAG CT TT GT CA GA AA AC AG									1126
DQ069805	GGG GT GGAT CC AT GC TT CT CC TT CC TT CAGTGAAG GA T AT GC TA T CT TA AG TAG CT TT GT CA GA AA AC AG									1152
AtPOP1-RACE	GGG GT GGAT CC AT GC TT CT CC TT CC TT CAGTGAAG GA T AT GC TA T CT TA AG TAG CT TT GT CA GA AA AC AG GTAG CT AT TT GT GT CT TT TT GAGG TT AT TTTT TT									1193
									
Spleißmuster	-----IntronIV-----									
At Chr 2	-UGA4-----IntronIV-----									
DQ069804	GTGACG TTT GT TT GTAG CT AT AT GT CT TT AC AT AT CT TT GTGGAGAT AA TGACAC CC CTCAAG TT CC TT CA TT CA GA TGAATGAGACAG GT GT CT CAG TT GTAT									1800
DQ069805	-----ATGAATGAGACAG GT GT CT CAG TT GTAT									1153
AtPOP1-RACE	-----ATGAATGAGACAG GT GT CT CAG TT GTAT									1179
	GTGACG TTT GT TT GTAG CT AT AT GT CT TT AC AT AT CT TT GTGGAGAT AA TGACAC CC CTCAAG TT CC TT CA AAAA AAAAAAAAA									1279

[illegible]

	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
									
Spleißmuster	-----ExonVI-----									
At Chr 2	TTGGGAAAAGCATCAAAGTCGTAATGGAATCTCTTTGCCCTCGATGACCCAGCTGCTGAGGTTCCAAAGGTAATCTAGTAGGCCCAAGGAGTTCAAGGTCCCTGT									
DQ069804	TTGGGAAAAGCATCAAAGTCGTAATGGAATCTCTTTGCCCTCGATGACCCAGCTGCTGAGGTTCCAAAGGTAATCTAGTAGGCCCAAGGAGTTCAAGGTCCCTGT									
DQ069805	TTGGGAAAAGCATCAAAGTCGTAATGGAATCTCTTTGCCCTCGATGACCCAGCTGCTGAGGTTCCAAAGGTAATCTAGTAGGCCCAAGGAGTTCAAGGTCCCTGT									
	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500
									
Spleißmuster	-----ExonVI-----IntronVI-----									
At Chr 2	CCTTTACTGCTTCTTAAACATAAAAAAATTGGGAAATGCGCCCTACTGGGTAAATGTAATCTGTAACGTTCTTGACGTTCTTTAGATTAAATGATCC									
DQ069804	CCTTTACTGCTTCTTAAACATAAAAAAATTGGGAAATGCGCCCTACTGG									
DQ069805	CCTTTACTGCTTCTTAAACATAAAAAAATTGGGAAATGCGCCCTACTGG									
	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
									
Spleißmuster	-----IntronVI-----ExonVII-----									
At Chr 2	AAAAGTAATCATGTGTTATTTCTTTTCAGATGGTCTCTTATTTCTTTCCCTTAGTTGGATCAAAGTCTTTCTGGAAATGCCTTCTGTTCTCAAAAAGGAGCTCATGC									
DQ069804	-----ATGGTCTCTTATTTCTTTCCCTTAGTTGGATCAAAGTCTTTCTGGAAATGCCTTCTGTTCTCAAAAAGGAGCTCATGC									
DQ069805	-----ATGGTCTCTTATTTCTTTCCCTTAGTTGGATCAAAGTCTTTCTGGAAATGCCTTCTGTTCTCAAAAAGGAGCTCATGC									
	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700
									
Spleißmuster	-----ExonVII-----IntronVII-----									
At Chr 2	AATAGGTCAGAGGGAGAAAACGCTGGGTTTTCATGTGATGTAATTTTCGCTCTCCCTAAACCTTTATTTCTCTGAAATGTTAAGATTCTCTTGTCTGCTATGTAACCTT									
DQ069804	AATAGGTCAGAGGGAGAAAACGCTGGGTTTTCATGTGAT									
DQ069805	AATAGGTCAGAGGGAGAAAACGCTGGGTTTTCATGTGAT									
	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800
									
Spleißmuster	-----IntronVII-----ExonVIII-----									
At Chr 2	GTTAAAATCTTATATTGAAAACTGTCTGAAAATGTTGAGGATGGTTTACCCCTTTTCCCATCAGATTCTTCCCCGACTGTAAAGCGT									
DQ069804	-----GATGGTTTACCCCTTTTCCCATCAGATTCTTCCCCGACTGTAAAGCGT									
DQ069805	-----GATGGTTTACCCCTTTTCCCATCAGATTCTTCCCCGACTGTAAAGCGT									

Spleißmuster		-----ExonVIII-----											
At Chr 2	DQ069804	ATTCATCTTTTACACTGAGCGAGGCTGCAGAC	TTGGAAGAAAAGGCACAAAGTCGCCCTCCAGCCA	TAAGACCTTTTCAGAA	TTCCCATTCACACCTCCCATG	2900							
	DQ069804	ATTCATCTTTTACACTGAGCGAGGCTGCAGAC	TTGGAAGAAAAGGCACAAAGTCGCCCTCCAGCCA	TAAGACCTTTTCAGAA	TTCCCATTCACACCTCCCATG	1959							
	DQ069805	ATTCATCTTTTACACTGAGCGAGGCTGCAGAC	TTGGAAGAAAAGGCACAAAGTCGCCCTCCAGCCA	TAAGACCTTTTCAGAA	TTCCCATTCACACCTCCCATG	1985							
Spleißmuster		2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3000	
Spleißmuster		-----ExonVII-----											
At Chr 2	DQ069804	GAA TAGTATCCATGTCACCCCGTTCTATTGGAGAGGGT	CCAA	TCAAAAGTTTTCAAGCAA	TGGGAGGAGTGTTGTGGAAA	TTTCCAGTTATGGTGGTAAT	3000						
	DQ069804	GAA TAGTATCCATGTCACCCCGTTCTATTGGAGAGGGT	CCAA	TCAAAAGTTTTCAAGCAA	TGGGAGGAGTGTTGTGGAAA	TTTCCAGTTATGGTGGTAAT	2059						
	DQ069805	GAA TAGTATCCATGTCACCCCGTTCTATTGGAGAGGGT	CCAA	TCAAAAGTTTTCAAGCAA	TGGGAGGAGTGTTGTGGAAA	TTTCCAGTTATGGTGGTAAT	2085						
Spleißmuster		3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100	
Spleißmuster		-----ExonVII-----											
At Chr 2	DQ069804	CTGTTTGA	TGGTATCGTGGCAAGAACA	TCAGATT	CGCTAACTATCTTTTTCTCCAAACA	TTCAACAAGTGACAAACA	TGCTTTTATTTCCCTCACAACACTTCAA	3100					
	DQ069804	CTGTTTGA	TGGTATCGTGGCAAGAACA	TCAGATT	CGCTAACTATCTTTTTCTCCAAACA	TTCAACAAGTGACAAACA	TGCTTTTATTTCCCTCACAACACTTCAA	2159					
	DQ069805	CTGTTTGA	TGGTATCGTGGCAAGAACA	TCAGATT	CGCTAACTATCTTTTTCTCCAAACA	TTCAACAAGTGACAAACA	TGCTTTTATTTCCCTCACAACACTTCAA	2185					
Spleißmuster		3110	3120	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	
Spleißmuster		-----ExonVII-----											
At Chr 2	DQ069804	AACCAAGCACAGACCTTATGATGACGCCT	CAAGAAGA	TGATAAAAAAGTAAGAGCT	CAGATCCA	TCAGAGTAGTAA	CAAAA	CTGGCCCTCGTCAGAGTTCT	3200				
	DQ069804	AACCAAGCACAGACCTTATGATGACGCCT	CAAGAAGA	TGATAAAAAAGTAAGAGCT	CAGATCCA	TCAGAGTAGTAA	CAAAA	CTGGCCCTCGTCAGAGTTT	2259				
	DQ069805	AACCAAGCACAGACCTTATGATGACGCCT	CAAGAAGA	TGATAAAAAAGTAAGAGCT	CAGATCCA	TCAGAGTAGTAA	CAAAA	CTGGCCCTCGTCAGAGTTT	2285				
Spleißmuster		3210	3220	3230	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300	
Spleißmuster		-----ExonVIII-----IntronVIII-----											
At Chr 2	DQ069804	TCTACATGCTTTCAAGGAAGGTTCTTT	CGAAGAAGGCGGGTTGTA	TGTGCA	CCAACTCTTGCAGACA	TATCA	TTGCTAAAA	TCCAGGTAACA	TC	CCAA	3300		
	DQ069804	TCTACATGCTTTCAAGGAAGGTTCTTT	CGAAGAAGGCGGGTTGTA	TGTGCA	CCAACTCTTGCAGACA	TATCA	TTGCTAAAA	TCCAG	-----		2346		
	DQ069805	TCTACATGCTTTCAAGGAAGGTTCTTT	CGAAGAAGGCGGGTTGTA	TGTGCA	CCAACTCTTGCAGACA	TATCA	TTGCTAAAA	TCCAG	-----		2372		

Spleißmuster At Chr 2 DQ069804 DQ069805	3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3380	3390	3400
									
	-----IntronVIII-----									
	GAATCCA	TGTTCAACAAA	TGTGATCCA	TGGAACTATTTCA	TTGGTATCACA	TTCTTATACA	TTATGTTTACAG	CTGCAGTGCAG	TGAGGAGAAGA	TGGG
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Spleißmuster At Chr 2 DQ069804 DQ069805	3410	3420	3430	3440	3450	3460	3470	3480	3490	3500
									
	-----ExonIX-----									
	CGTGTACAA	TCCCACAA	TCCTCTGTAAG	TTCTTACTTCAAGAA	CAACCTTTG	TGGAACCTTGGAA	CTTAAATGTTCC	TGAAGACAC	CTTTACAGAGCAAT	
	CGTGTACAA	TCCCACAA	TCCTCCGTAAG	TTCTTACTTCAAGAA	CAACCTTTG	TGGAACCTTGGAA	CTTAAATGTTCC	TGAAGACAC	CTTTACAGAGCAAT	
Spleißmuster At Chr 2 DQ069804 DQ069805	3510	3520	3530	3540	3550	3560	3570	3580	3590	3600
									
	-----ExonIX-----									
	CTCATAGATGGCCCA	ATCGGGTTTGTAA	CAACAGGATTTGTACG	TGGAGGTAAAA	CTAAAAAA	CTTAAATGTTGAG	TACAGGTCGCCAGAGGCTG			
	CTCATAGATGGCCCA	ATCGGGTTTGTAA	CAACAGGATTTGTACG	TGGAGGTAAAA	CTAAAAAA	CTTAAATGTTGAG	TACAGGTCGCCAGAGGCTG			
Spleißmuster At Chr 2 DQ069804 DQ069805	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700
									
	-----IntronIX-----									
	ATTTGGTTTCTGAGCT	CTTAAACCTGCTTTAT	TGTGTAGTAA	AAAGCCGGCCGCGG	CCGAAGCTTCTGTGA	TGCGGTGTTT	TAGGAGACTAAAGAGAT			
	ATTTGGTTTCTGAGCT	CTTAAACCTGCTTTAT	TGTGTAGTAA	AAAGCCGGCCGCGG	CCGAAGCTTCTGTGA	TGCGGTGTTT	TAGGAGACTAAAGAGAT			
Spleißmuster At Chr 2 DQ069804 DQ069805	3710	3720	3730	3740	3750	3760	3770	3780	3790	3800
									
	-----ExonX-----									
	GAGCAA	TGGAGAGACAAA	GATGAAGACGGAGGA	GAAGACAGATTTAT	TGTTTATGTTT	TAGTTAGAAA	CCCTAAGATCTTCTGCTTT	TAGACTCGCACCTT	TGCTACGA	
	GAGCAA	TGGAGAGACAAA	GATGAAGACGGAGGA	GAAGACAGATTTAT	TGTTTATGTTT	TAGTTAGAAA	CCCTAAGATCTTCTGCTTT	TAGACTCGCACCTT	TGCTACGA	
Spleißmuster At Chr 2 DQ069804 DQ069805	3810	3820	3830	3840	3850	3860	3870	3880	3890	3900
									
	-----ExonX-----									
	GAGCAA	TGGAGAGACAAA	GATGAAGACGGAGGA	GAAGACAGATTTAT	TGTTTATGTTT	TAGTTAGAAA	CCCTAAGATCTTCTGCTTT	TAGACTCGCACCTT	TGCTACGA	
	GAGCAA	TGGAGAGACAAA	GATGAAGACGGAGGA	GAAGACAGATTTAT	TGTTTATGTTT	TAGTTAGAAA	CCCTAAGATCTTCTGCTTT	TAGACTCGCACCTT	TGCTACGA	

-----UAA5-3'-UTR-----											
Spleißmuster											
At Chr 2	TTGTCT	TTGGAGCAACAAGACT	TTGTGA	GTCCAC	TGCTTTTAAAA	TGCA	TTTTTTAAAA	TTCAAA	TTGTTTTTTTTTTT	TTGATCAAA	TTATCTATTTT
DQ069804	TTGTCT	TTGGAGCAACAAGACT	TTGTGA	GTCCAC	TGCTTTTAAAA	TGCA	TTTTTTAAAA	TTCAAA	TTGTTTTTTTTTTT	TTGATCAAA	TTATCTATTTT
DQ069805	TTGTCT	TTGGAGCAACAAGACT	TTGTGA	GTCCAC	TGCTTTTAAAA	TGCA	TTTTTTAAAA	TTCAAA	TTGTTTTTTTTTTT	TTGATCAAA	TTATCTATTTT

-----3'-UTR-----											
Spleißmuster											
At Chr 2	TACTTCA	TACAA	TAAAAAA	TATAGAAA	TTTAGTGGAA	TTTGGAAA	TTTATACCCAA	CTTATCTG	TTTTTTTTTTTTTT	TTTGGGACAAAA	AGTCAATGC
DQ069804	TACTTCA	TACAA	TAAAAAA	TATAGAAA	TTTAGTGGAA	TTTGGAAA	TTTATACCCAA	CTTATCTG	TTTTTTTTTTTTTT	TTTGGGACAAAA	AGTCAATGC
DQ069805	TACTTCA	TACAA	TAAAAAA	TATAGAAA	TTTAGTGGAA	TTTGGAAA	TTTATACCCAA	CTTATCTG	TTTTTTTTTTTTTT	TTTGGGACAAAA	AGTCAATGC

-----3'-UTR-----											
Spleißmuster											
At Chr 2	ATGGAA	TGTAAAAA	AAAAA	AGTGC	TAAAAA	TTAA	TTATAT	TGTTAG	AAAAAGAC	TAGAGAA	TGATTTTGTATGGTATCGAA
DQ069804	ATGGAA	TGTAAAAA	AAAAA	AGTGC	TAAAAA	TTAA	TTATAT	TGTTAG	AAAAA		
DQ069805	ATGGAA	TGTAAAAA	AAAAA	AGTGC	TAAAAA	TTAA	TTATAT	TGTTAG	AAAAA		

Abb. 86: Alignment der AtPOP1-Spleißvarianten mit der Chromosomalen Region

Transkriptionsstart: ***, Translationsstart: AUG1 bzw. AUG2. Stopcodon für AtPOP1-1, us (Menzel, 2002) ist UAA1; für DQ089805: UAG2 (mit AUG1 als Startcodon) bzw. UAA5 (mit AUG2 als Startcodon); für AtPOP1-1, s (NM_130297.1; AAB63829.1; Accession removed): UGA3; für AtPOP1-RACE: UGA4 (FN673552); für DQ089804: UAA5. At Chr 2: die für AtPOP1p kodierende Genomregion auf Chromosom 2; Promotor: bezeichnet den bioinformatisch ermittelten, 480 Bp langen Promotorbereich (O'Connor et al., 2005); 5'-/3'-UTR: untranslatierte Sequenzbereiche am 5'- bzw. 3'-Ende der mRNA; DQ089804, DQ089805: aus ESTs ermittelte, annotierte mRNAs aus der NCBI-Datenbank.

Alignment der POP1 Proteine:

[illegible][illegible]

[illegible][illegible]

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
Afu	QRP	I	P	T	I	L	I	R	C	A	D	K	A	E	D	V	M	D	A	D	G	P	K	K	S	Q	K	D	R	-----	K	K	L	F	I	R	H	P	S	A	F	L	Q	L	W	N	E	L	G	I	S	K	R	Q	N	P	P	V	M	E	D	L	R	F	E	I	G	E	I	T	G	P	G	T	E	A	L	L	S	A	L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
Spo	-	E	L	I	C	P	C	F	L	Q	N	N	P	T	E	D	D	K	K	Q	I	P	V	K	N	P	T	E	C	-----	V	Q	L	V	I	R	L	H	P	S	A	F	L	Q	A	W	N	L	S	G	I	A	V	L	D	D	R	I	A	M	H	D	W	R	L	D	L	A	S	F	D	I	H	G	P	D	S	N	I	M	L	H	K	V	F	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Sce	T	K	P	L	G	P	C	D	V	F	W	Q	K	-----	D	T	A	I	R	L	H	P	S	I	Y	T	Q	V	F	N	L	L	Q	H	E	K	L	T	V	D	C	R	Y	S	L	A	S	V	I	L	G	A	K	A	E	S	L	A	S	C	L	R	S	T	E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
Ddi	F	H	F	I	C	P	A	K	Y	L	I	W	K	Q	D	N	N	N	N	N	N	D	N	Q	-----	R	K	I	W	I	H	P	A	A	L	E	I	T	F	I	F	E	-----	K	S	A	S	Q	F	N	L	I	N	N	L	E	Q	L	R	F	E	L	T	G	S	K	H	S	I	N	S	I	L																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Dme	Y	G	A	L	Q	R	A	S	F	W	R	P	R	R	E	E	E	D	E	K	Q	T	N	-----	H	T	L	W	I	L	H	P	S	G	A	Q	A	V	L	N	Q	I	S	V	F	Q	L	K	S	T	R	Q	K	L	P	N	E	A	V	T	E	E	K	M	D	V	K	I	E	P	F	E	L	S	K	E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
Mmu	R	E	M	L	G	P	V	T	F	I	W	K	S	R	M	T	P	E	D	A	S	E	D	-----	R	Q	L	W	I	L	H	P	T	L	K	L	A	V	L	E	E	I	-----	K	A	A	C	Q	C	V	E	P	I	K	S	A	V	C	I	A	D	P	L	T	P	S	E	K	S	Q	T	E	L	P	D	E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
Hsa	R	E	M	L	G	P	V	T	F	I	W	K	S	Q	R	T	P	D	P	S	E	S	-----	R	Q	L	W	I	L	H	P	T	L	K	L	A	V	L	E	E	I	-----	K	F	A	C	Q	K	L	M	D	E	T	G	I	L	I	N	C	F	S	L	E	G	Q	L	A	K	L	E	V	M	G	S	K	A	F																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
Vvi	S	K	S	I	A	P	V	T	Y	M	W	R	P	I	E	K	K	D	I	G	I	G	A	E	H	D	V	D	S	V	N	S	-	T	Q	T	Y	E	C	C	S	S	F	R	Q	L	W	W	M	H	A	S	A	F	N	E	G	Y	D	A	L	-----	R	A	A	C	H	Q	Q	M	E	S	G	D	T	I	S	C	C	S	L	E	G	K	M	A	R	L	E	V	M	G	S	N	A	M																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Osa	L	E	I	V	G	P	V	T	Y	M	W	R	P	I	F	R	E	G	G	E	L	E	T	E	D	V	D	L	S	N	S	-	Q	I	I	S	D	E	R	N	S	L	R	Q	L	W	I	H	P	S	A	L	S	E	G	L	E	T	-----	R	A	A	C	H	Q	Q	M	E	T	G	I	L	I	N	C	F	S	L	E	G	Q	L	A	K	L	E	V	M	G	S	N	A	M																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
Ath	S	Q	A	I	A	P	V	T	Y	M	W	R	P	S	K	I	P	K	R	N	E	E	K	G	G	D	G	I	G	T	D	L	P	V	S	D	K	D	H	E	D	F	R	K	L	W	I	H	A	S	S	F	S	E	G	Y	A	I	L	-----	R	A	A	C	H	Q	Q	M	E	T	G	I	L	I	N	C	F	S	L	E	G	Q	L	A	K	L	E	V	M	G	S	N	A	M																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Ath	S	Q	A	I	A	P	V	T	Y	M	W	R	P	S	K	I	P	K	R	N	E	E	K	G	G	D	G	I	G	T	D	L	P	V	S	D	K	D	H	E	D	F	R	K	L	W	I	H	A	S	S	F	S	E	G	Y	A	I	L	-----	R	A	A	C	H	Q	Q	M	E	T	G	I	L	I	N	C	F	S	L	E	G	Q	L	A	K	L	E	V	M	G	S	N	A	M																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Ath	S	Q	A	I	A	P	V	T	Y	M	W	R	P	S	K	I	P	K	R	N	E	E	K	G	G	D	G	I	G	T	D	L	P	V	S	D	K	D	H	E	D	F	R	K	L	W	I	H	A	S	S	F	S	E	G	Y	A	I	L	-----	R	A	A	C	H	Q	Q	M	E	T	G	I	L	I	N	C	F	S	L	E	G	Q	L	A	K	L	E	V	M	G	S	N	A	M																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
(1)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														

Afu	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
Spo	AINRRRTLACGVYPPAEASD-----										
Sce	LTATPNSINKTTVPFKESD-----										
Ddi	ELWDEEKRSYMSKNIENHKVNERRKRIKDLDQNSFIKDDNSTTKNQLP-----										
Dme	HLVVDPRLQRPKKRTKAVCKMEQPPLSAGDLLMNQPSLPEPILWSKKARERLAKGIMSAHKYDQLREQHNAVPGAPCAFEEQQM-----										
Mmu	LHQREQEAVFELLGGISSPAEIPACTILCLTVRDPVNLPPQRSRALPDPERYQVSFTCEEEMCTGSWSCAHWKPLSDHTDDPANERVKQLLLLEGVPVAC										
Hsa	LHCRQEAIFELLGGITSPAEIFACTILCLTVGDPRIINLPQKKSNALPNPEKCQ-----DNEKVRQLLLLEGVPEEC										
Vvi	NVLCMEKHQHRIAFFCLSDSQGIINTSSDAQH-----										
Osa	SGIGNILSSIWINPGNHDIALSDCRELWDSSSLKINPPVDEKILCMEKHRRMKFFCLDSGNDQGQTSQEKDSIG-----										
Ath (1)	DANSELTPPEEENMLCWEKHQSRMDSLCLDDPAAEVVKVSSRPSS-----										
Ath (2)	DANSELTPPEEENMLCWEKHQSRMDSLCLDDPAAEVVKVSSRPSS-----										
Afu	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
Spo	-----PKIPVMILASRSTSQSKNT--NAPGTWTVLPLPWKCVLPLWYSLMYYPSSGGTVRF										
Sce	-----EVIIPVYITYRKE-----WNGLTIVILPWYAKFVWR-----KMMYQKG-IRF										
Ddi	-----PSIPLVLIIRRLK-----TRDWIVVLPWFVLLPLWH-----LLNRIPRMYH										
Dme	-----PSTPTIMLIQRDGGGLTR-----GYSGWDIIVPGGGLAFWI-----PLIYAG-AWS										
Mmu	-----QALPVILIQRPQSQDPRYKRLGYCGWDVIAPAGYGMTLWL-----TLTMWG-ARP										
Hsa	AHSFIWDQDICRSVTENKLLDQDLNMRSELLLVPGSQDLGARESKIPIILLIQPGKVTGEDRL-GWGSGLDVLIPKGGMAFWI-----PFIYRG-ARV										
Vvi	THSFIWNQDICKSVTENKISDQDLNMRSELLLVPGSQDLILGPHESKIPIILLIQPGKVTGEDRL-GWGSGLDVLIPKGGMAFWI-----PFIYRG-VRV										
Osa	-----GSCPILLLLKSNQ-----KMGIGWSIILPLSWVKAFWI-----PLVSN-G-AHA										
Ath	-----RSCPVILLKHAAGS-----LISVGWSVILPLSWVKPFWF-----YLVSHG-AHA										
Ath (1)	-----RSCPLLLLLKHKKLG-----NAPTGWSLIILPLSWIKVFWN-----AFVSKG-AHA										
Ath (2)	-----RSCPLLLLLKHKKLG-----NAPTGWSLIILPLSWIKVFWN-----AFVSKG-AHA										
PLD	-----GWTILILPWGGLPFWI-----SLVIYG-VRA										
CORIII	-----CORIII.....										

231

	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
Afu	AAATV	KISLLHRC	SPNPAARIYRLP	TTPDLRQEWLRLAS	DERKSKSRKAP	HPQGHLLQQAQSPSAAQGDARQKLAASLITPA	1090	1100
Spo	-----	DEDK	TLQLVRVQVLVQR	CSLQDRARIYCLSD	DD-ELSKWKTIIYKENLTAENLLYPKCPNE	-----	-----	-----	-----	-----
Sce	-----	SSSF	LTFFPRCIIAVSCTLLER	CHPKDNARIYQVPEK	-DLEHWLQLAKGVYRPNGRKDDHLKIPLEV	-----	-----	-----	-----	-----
Ddi	-----	FNQETINE	ANDRGLVRVSIKMFNRCK	-PLPNSIIYFPLESD	IQLLSYKYYKRDYKPIELITPKLTKNMNPNTIDQLYKYIDEMT	-----	-----	-----	-----	-----
Dme	-----	-----	AIQIQQLLSRCH	-VKDNALICLPTAAD	HKKRWRLKHNDAQPVHVEPTQDLNEQLRKELELQSHKLKLRLSRRVREKR	-----	-----	-----	-----	-----
Mmu	-----	NVCL	SILNDFPRAIVWVLSLLRKGS	-PEPHTMICVPSKED	LHRLSQDQCYHGPWE	SRHSDPFKSLILKEKEKKKKEKRQDGEHRASEGQAAGP	-----	-----	-----	-----
Hsa	-----	EACLSILGHF	PRAIVWVLSLLSKGS	-PEPHTMICVPAKED	FLQLHEDWHYCGPQES	KHSDPFRSKILKQEKKKKREKRQPCGRASSDGPAGEE	-----	-----	-----	-----
Vvi	-----	NGASPINSERNIC	FLIRVLLHAYKEGS	-FEEGAVVCAPIHLS	DISMTWTSRSTRSETG	-LQIPQSSVRSYFKEQSSCKWEIQIPEDTVTRESN	-----	-----	-----	-----
Osa	-----	DNVKTGCSINRL	CIVRVLLIRAFKEGS	-FEEGAVVCAPIHLS	DISAMNRKTRSEEEEEECLEKWEIQI	PQSHVSSYFQPCGTWEINVPEDTITTEQSH	-----	-----	-----	-----
Ath (1)	-----	AQIHQSSNKLCIVRVLLHAFKEGS	-FEEGAVVCAPIHLS	DISAMNRKTRSEEEEEECLEKWEIQI	PQSHVSSYFQPCGTWEINVPEDTITTEQSH	-----	-----	-----	-----	-----
Ath (2)	-----	AQIHQSSNKLCIVRVLLHAFKEGS	-FEEGAVVCAPIHLS	DISAMNRKTRSEEEEEECLEKWEIQI	PQSHVSSYFQPCGTWEINVPEDTITTEQSH	-----	-----	-----	-----	-----
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Afu	ADTESRKEHLPIPTE	-----	-----	EDLIGFVTTT	-GNYNLS	EGKGTIGSILVSKVAASGKGQARER	-----	-----	-----
Spo	-----	-----	-----	-----	TAIIGFVTTT	-GNFNLNAGKPSGI	-ANVLA	KTIKNEKS	-----	-----
Sce	-----	-----	-----	-----	HDLICFITS	-CTYHLNCGNGMGIGFI	DHHA	AIRQPT	-----	-----
Ddi	-----	-----	-----	-----	RKPIGYVTIN	-GEQSLVRGFGSGVGFC	SAVD	FIRLHNLS	EKNYS	PK
Dme	-----	RLQETATKRVHIRPANTAH	LVRGQLQEMCR	LWLPTDPAELRDSVRRQCS	RQVFGYVSTAG	-FSFT	EALVCAVGYVTPAGLQQLIEELPASKGNRKQPP	-----	-----	-----
Mmu	-----	PIAGQ	EALTG	LWSGGLPLG	LSHCS	-----	-----	-----	-----	-----
Hsa	-----	PVAGQ	EALTG	LWSGGLPRVTL	HCS	-----	-----	-----	-----	-----
Vvi	-----	-----	-----	-----	RQPIGFVTTT	-G	FV	RGSKKLKAEALCEAILLARLEEQWNEMPMKERRKE	-----	-----
Osa	-----	KAF	-----	-----	RWPIGFVTTT	-G	FV	HSSGQD	AVAVAFCEAKLLAVLRRQQRWTHESLKRKD	-----
Ath (1)	-----	-----	-----	-----	RWPIGFVTTT	-G	FV	RGSKKPAAEAFCD	AVLLGRLRDEQWRDKDVR	RRKKQ
Ath (2)	-----	-----	-----	-----	RWPIGFVTTT	-G	FV	RGSKKPAAEAFCD	AVLLGRLRDEQWRDKDVR	RRKKQ
CORIV	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

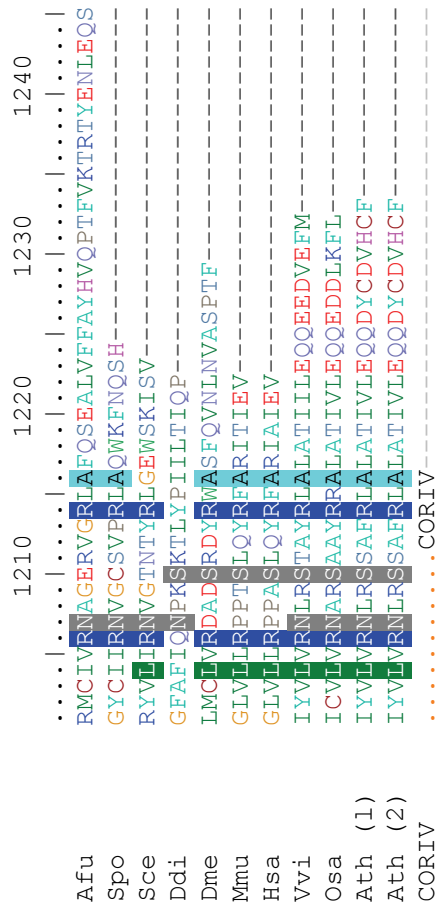


Abb. 87: Vergleich der Proteinsequenzen von AtPOP1p-Varianten und POP1p-Homologen anderer Organismen

Die konservierten Regionen (COR I-COR IV) sind unterhalb der Sequenzen durch Linien markiert. Sequenzidentitäten über 65 % sind farbig gekennzeichnet. Afu: *Aspergillus fumigatus*; Spo: *Saccharomyces pombe*; Sce: *Saccharomyces cerevisiae*; Ddi: *Dictyostelium discoideum*; Dme: *Drosophila melanogaster*; Mmu: *Mus musculus*; Hsa: *Homo sapiens*; Vvi: *Vitis vinifera*; Osa: *Oryza sativum*; Ath: *Arabidopsis thaliana*. Folgende Varianten von AtPOP1p sind dargestellt: 34,6 kDa-Protein, Accession: FN673552 (diese Arbeit); Ath (1): *Arabidopsis thaliana*, 92,5 kDa-Protein, Accession: NP_001084603 Ath (2): *Arabidopsis thaliana*, 73,8 kDa-Protein, Accession: NP_001084604; PLD: konservierte POP1-Domäne (Cdd:pfam06978), PLD: konservierte POPLD-Domäne.

Alignment der *Rpp30* mRNAs:

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Spleißmuster
At Chr 5  GCTTTGATTTTTCAGATAATTGACCTGGACGCTGTTTGTGTTTATAATAAGAGGGCTTTTGTGTTTCAACCACTCCGATTTAAATAACCCCACTAAACGGCTGTTTAAG 100
Promotor  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          CAGATAATTGACTGGACGCTGTTTGTGTTTATAATAAGAGGGCTTTTGTGTTTCAACCACTCCGATTTAAATAACCCCACTAAACGGCTGTTTAAG 88

110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Spleißmuster
At Chr 5  CTCAAATCCCTTGTCAAATCTGATATGACATGATAGCCGTCGATTTGATTTTAAATCAACGGTTATTTAAATTTGTGATCCGCACTGATAACTACATAAGTGTTCCTTC 200
Promotor  CTCAAATCCCTTGTCAAATCTGATATGACATGATAGCCGTCGATTTGATTTTAAATCAACGGTTATTTAAATTTGTGATCCGCACTGATAACTACATAAGTGTTCCTTC 188

210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Spleißmuster
At Chr 5  AGAGCTTCGCTTTGTAGTTACTAGTTGCAATGGGCTGGCTTACTTTTAAATGGGCCGGTTATGGAATCGAAACCAAACTTCCTTTATTTTCGAAATACGCAG 300
Promotor  AGAGCTTCGCTTTGTAGTTACTAGTTGCAATGGGCTGGCTTACTTTTAAATGGGCCGGTTATGGAATCGAAACCAAACTTCCTTTATTTTCGAAATACGCAG 288

310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Spleißmuster
At Chr 5  GCGTTTCGGTAACATGCCCTCATACGTCGTCGGTTGCAATAGTAAATAAAATTTTATTTCTTTTCTTTCTTTTGGTCGTAATTTTATAATTTCTTC 400
Promotor  GCGTTTCGGTAACATGCCCTCATACGTCGTCGGTTGCAATAGTAAATAAAATTTTATTTCTTTTCTTTCTTTTGGTCGTAATTTTATAATTTCTTC 388

410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Spleißmuster
At Chr 5  TCCATAAAATCGGTGAAGTATCTAAAAACCCGTTATTTAAATGCTTAAACCCCTAAATCGGAAAACTCTCCGCCACCTGTTCTCTCCGACTCACATAATGGGATT 500
Promotor  TCCATAAAATCGGTGAAGTATCTAAAAACCCGTTATTTAAATGCTTAAACCCCTAAATCGGAAAACTCTCTCCGCCACCTGTTCTCTCCGACTCACATA----- 480
AtRpp30 - 0 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
AtRpp30 1-3 -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          ATCTAAAAACCCGTTATTTAAATGCTTAAACCCCTAAATCGGAAAACTCTCTCCGCCACCTGTTCTCTCCGACTCACATAATGGGATT 82

```

Spleißmuster	
At Chr 5	510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
AtRpp30 - 0
AtRpp30 1-3	-----ExonI----- CTTCGATCTTAGCATTCGGTACAAATGAGCCGCCACGATCAGGTGGTAAGGAAAATCGCCGGCGGGAACCTTACGATTAAAGCTCGCCACGAAAGCCATG 600 CTTCGATCTTAGCATTCGGTACAAATGAGCCGCCACGATCAGGTGGTAAGGAAAATCGCCGGCGGGAACCTTACGATTAAAGCTCGCCACGAAAGCCATG 108 CTTCGATCTTAGCATTCGGTACAAATGAGCCGCCACGATCAGGTGGTAAGGAAAATCGCCGGCGGGAACCTTACGATTAAAGCTCGCCACGAAAGCCATG 182
Spleißmuster	
At Chr 5	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
AtRpp30 - 0
AtRpp30 1-3	-----ExonI----- GAGCTAGGCTATGTTGGGATCGCACATAAACCGTTTCGATCAAAAGCGTAATGTCGACAAAGACTCTTTGACGATCCCTCTTCTCACTCTTGGGTCTCTAA 700 GAGCTAGGCTATGTTGGGATCGCACATAAACCGTTTCGATCAAAAGCGTAATGTCGACAAAGACTCTTTGACGATCCCTCTTCTCACTCTTGGGTCTCTAA 208 GAGCTAGGCTATGTTGGGATCGCACATAAACCGTTTCGATCAAAAGCGTAATGTCGACAAAGACTCTTTGACGATCCCTCTTCTCACTCTTGGGTCTCTAA 282
Spleißmuster	
At Chr 5	710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
AtRpp30 - 0
AtRpp30 1-3	-----ExonI----- TCAAAGTCGTCGCGGGTTAGCTTCTTCTGTCGGATTCCTATCGCGATTTTACTCGGTGTTCCGGGAACCTACTCCGTTTTCGGCAGTACACGGCTCTCACAGT 800 TCAAAGTCGTCGCGGGTTAGCTTCTTCTGTCGGATTCCTATCGCGATTTTACTCGGTGTTCCGGGAACCTACTCCGTTTTCGGCAGTACACGGCTCTCACAGT 308 TCAAAGTCGTCGCGGGTTAGCTTCTTCTGTCGGATTCCTATCGCGATTTTACTCGGTGTTCCGGGAACCTACTCCGTTTTCGGCAGTACACGGCTCTCACAGT 382 -----CCGCGGTTAGCTTCTTCTGTCGGATTCCTATCGCGATTTTACTCGGTGTTCCGGGAACCTACTCCGTTTTCGGCAGTACACG----- 78
Spleißmuster	
At Chr 5	810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
AtRpp30 - 0
AtRpp30 1-3	-----ExonI----- TCAATGTGGAGAGTAAATGCTCAGTGTTCAGAGTTTGAATTCCTGGGAAATCCGATTCCTAAAGAGTTATGATAATTAATGCTGTAGGCCCGATGAATCAGAAACGCT 900 TCAATGTGGAGAGTAAATGCTCAGTGTTCAGAGTTTGAATTCCTGGGAAATCCGATTCCTAAAGAGTTATGATAATTAATGCTGTAGGCCCGATGAATCAGAAACGCT 408 TCAATGTGGAGAGTAAATGCTCAGTGTTCAGAGTTTGAATTCCTGGGAAATCCGATTCCTAAAGAGTTATGATAATTAATGCTGTAGGCCCGATGAATCAGAAACGCT 482
Spleißmuster	
At Chr 5	910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
AtRpp30 - 0
AtRpp30 1-3	-----ExonI----- TTTCGATTAATGCCCTGTGAGAAAAGCTGAGGTTTGAAATTTCTCTCTTTTCTGTATAAAAAATCAAATCTTTAGTTTTTGTAGCTCAAATTTGGAGTTTTTTTAGTT 1000 TTTCGATTAATGCCCTGTGAGAAAAGCTGAG----- 435 TTTCGATTAATGCCCTGTGAGAAAAGCTGAG----- 509

	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
									
Splei8muster	IntronI									
At Chr 5	AGGA	TTAACTCTT	AGCTT	GTGTTT	GTGTTT	GTGTTT	GTGTTT	GTGTTT	GTGTTT	GTGTTT
AtRpp30 - 0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtRpp30 1-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
									
Splei8muster	IntronII									
At Chr 5	CTGCTA	TTTTCAGG	TTTTCAGG	TTTTCAGG	TTTTCAGG	TTTTCAGG	TTTTCAGG	TTTTCAGG	TTTTCAGG	TTTTCAGG
AtRpp30 - 0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtRpp30 1-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
									
Splei8muster	IntronIII									
At Chr 5	ATTTA	CTTTGAGAT	TAAGT	ACTCT	GATAT	CTCTAT	GGATG	CGACAA	CGAGGAC	CAAGT
AtRpp30 - 0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtRpp30 1-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
									
Splei8muster	IntronIII									
At Chr 5	GTCAA	TTAGTT	GATCA	TGTG	AAAGTT	TTATG	AGAACT	TTGCT	TTATG	AGAACT
AtRpp30 - 0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtRpp30 1-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
									
Splei8muster	IntronIV									
At Chr 5	CTAA	TTTAT	CAAGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
AtRpp30 - 0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AtRpp30 1-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Spleißmuster											
At Chr 5	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600	
AtRpp30 - 0	-----ExonIV-----									
AtRpp30 1-3	GAGCTGCCATTTCAAAAAATTTAGGTA	TGTA	TCAAAATTCGTC	TAGCAATTTGT	TTATTTGATGCT	TAAGCGTCA	TTGAGAA	TGGATTTAA	TTTAA	TTGCT	
	GAGCTGCCATTTCAAAAAATTTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	749	
	GAGCTGCCATTTCAAAAAATTTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	TTAGGTA	823	
Spleißmuster											
At Chr 5	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	
AtRpp30 - 0	-----ExonV-----									
AtRpp30 1-3	TTTCAGGAAATGATAGCCAAAGTTT	TAAAGAAAAACGGTTT	CACAAAGAAAGCTG	TCAGGGTTGAA	TTAC	TTTCTGCTGGTGAT	AC	TTT	AGCCTCGAAC	1700	
	TTTCAGGAAATGATAGCCAAAGTTT	TAAAGAAAAACGGTTT	CACAAAGAAAGCTG	TCAGGGTTGAA	TTAC	TTTCTGCTGGTGAT	AC	TTT	AGCCTCGAAC	844	
	TTTCAGGAAATGATAGCCAAAGTTT	TAAAGAAAAACGGTTT	CACAAAGAAAGCTG	TCAGGGTTGAA	TTAC	TTTCTGCTGGTGAT	AC	TTT	AGCCTCGAAC	918	
Spleißmuster											
At Chr 5	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	
AtRpp30 - 0	-----ExonV-----									
AtRpp30 1-3	AGCCTCTGTGAAAGTTGCA	TGAAA	TGGGATCGCC	TTTCGAGCGGTGAAGGTGACA	TGCTTTTGGATGA	CTTTGCAAAAGGCTTTTGA	TGCCACAAAATGT	1800			
	AGCCTCTGTGAAAGTTGCA	TGAAA	TGGGATCGCC	TTTCGAGCGGTGAAGGTGACA	TGCTTTTGGATGA	CTTTGCAAAAGGCTTTTGA	TGCCACAAAATGT	944			
	AGCCTCTGTGAAAGTTGCA	TGAAA	TGGGATCGCC	TTTCGAGCGGTGAAGGTGACA	TGCTTTTGGATGA	CTTTGCAAAAGGCTTTTGA	TGCCACAAAATGT	1018			
Spleißmuster											
At Chr 5	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	
AtRpp30 - 0	-----ExonV-----									
AtRpp30 1-3	TGTGGCGCACAAA	TCC	TCGAAGGCGATG	ATTTTCA	CCCTCTGTTT	CTGATGGCTTGCCAAAACATGG	TTTCCGGGTTAAGGATAT	TGTAGGAACTGAA	TCA	1900	
	TGTGGCGCACAAA	TCC	TCGAAGGCGATG	ATTTTCA	CCCTCTGTTT	CTGATGGCTTGCCAAAACATGG	TTTCCGGGTTAAGGATAT	TGTAGGAACTGAA	TCA	1044	
	TGTGGCGCACAAA	TCC	TCGAAGGCGATG	ATTTTCA	CCCTCTGTTT	CTGATGGCTTGCCAAAACATGG	TTTCCGGGTTAAGGATAT	TGTAGGAACTGAA	TCA	1118	
Spleißmuster											
At Chr 5	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	
AtRpp30 - 0	-----ExonV-----									
AtRpp30 1-3	GTGACTCAGCCCTTC	GCAGCTAAGGTGA	TTTGACAC	TCAGGTCACAGTAG	TAA	TCAAGTTTCTGAACTAC	GTATGGCCACAGCTTCATCTGATGATAACC	2000			
	GTGACTCAGCCCTTC	GCAGCTAAGGTGA	TTTGACAC	TCAGGTCACAGTAG	TAA	TCAAGTTTCTGAACTAC	GTATGGCCACAGCTTCATCTGATGATAACC	1144			
	GTGACTCAGCCCTTC	GCAGCTAAGGTGA	TTTGACAC	TCAGGTCACAGTAG	TAA	TCAAGTTTCTGAACTAC	GTATGGCCACAGCTTCATCTGATGATAACC	1218			

-----ExonV-----														
TTTCGGGAAA														
TTTCGGGAAA														
TTTCGGGAAA														
-----ExonV-----														
.....														

	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600				
													
	-----ExonV-----													
Spleißmuster														
At Chr 5														
AtRpp30 - 0														
	GGAAGCAAA-TCA	GACGAGTACA	TGGAGGTACAA	TGGAAGACCA	GAGTGCA	TGAAACAGGTGACAG	TAAGA	TTATCTCTCTAACTTA	TCCTCTGAGAC	2598				
AtRpp30 1-2														
	GGAAGCAAA-TCA	GACGAGTACA	TGGAGGTACAA	TGGAAGACCA	GAGTGCA	TGAAACAGGTGACAG	TAAGA	TTATCTCTCTAACTTA	TCCTCTGAGAC	1742				
AtRpp30 - 3														
	GGAAGCAAA-TCA	GACGAGTACA	TGGAGGTACAA	TGGAAGACCA	GAGTGCA	TGAAACAGGTGACAG	TAAGA	TTATCTCTCTAACTTA	TCCTCTGAGAC	1702				
AI995032														
	GGAAGCAAA-TCA	GACGAGTACA	TGGAGGTACAA	TGGAAGACCA	GAGTGCA	TGAAACAGGTGACAG	TAAGA	TTATCTCTCTAACTTA	TCCTCTGAGAC	1742				
H36851														
	GGNAGNAAAA	TNACGGCGGTAC	-----											
	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700				
													
	-----ExonVI-----													
Spleißmuster														
At Chr 5														
AtRpp30 - 0														
	TACCGATTGCTAAG	TGAATCAGG	TAAA	CTCTCAG	TCCAGATGCGGTG	TGCAAGACCA	TGACGAAAGCA	TCAAGACTAGAG	TCCTGAGACAAAGCTC	2698				
AtRpp30 - 1														
	TACCGATTGCTAAG	TGAATCAGG	TAAA	CTCTCAG	TCCAGATGCGGTG	TGCAAGACCA	TGACGAAAGCA	TCAAGACTAG	-----	1822				
AtRpp30 - 2														
	-----Intron Va-----													
	TCCAGATGCGGTG	TGCAAGACCA	TGACGAAAGCA	TCAAGACTAGAG	TCCGATGAGAC	TAAGAGCTC	1766							
AtRpp30 - 3														
	-----Intron Vb-----													
	ATGCGGTG	TGCAAGACCA	TGACGAAAGCA	TCAAGACTAGAG	TCCGATGAGAC	TAAGAGCTC	1761							
AI995032														
	TACCGATTGCTAAG	TGAATCAGG	TAAA	CTCTCAG	TCCAGATGCGGTG	TGCAAGACCA	TGACGAAAGCA	TCAAGACTAGAG	TCCGATGAGACAAAGCTC	1842				

	TCCAGATGCGGTG	TGCAAGACCA	TGACGAAAGCA	TCAAGACTAGAG	TCCGATGAGAC	TAAGAGCTC	310							
	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800				
													
	-----ExonVI-----													
Spleißmuster														
At Chr 5														
AtRpp30 1-3														
	GAGGAAGAGGCA	TCAGTTCCAAA	CCCAACACACCTTTGAGA	TAACAA	TGGAAGACAA	TAAGGTCGAAAGAG	TTAAACAA	TTGAAAGACGAGAAAGG	TTGAAAAAGA	2798				
AI995032														
	GAGGAAGAGGCA	TCAGTTCCAAA	CCCAACACACCTTTGAGA	TAACAA	TGGAAGACAA	TAAGGTCGAAAGAG	TTAAACAA	TTGAAAGACGAGAAAGG	TTGAAAAAGA	1942				
	GAGGAAGAGGCA	TCAGTTCCAAA	CCCAACACACCTTTGAGA	TAACAA	TGGAAGACAA	TAAGGTCGAAAGAG	TTAAACAA	TTGAAAGACGAGAAAGG	TTGAAAAAGA	410				
	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880	2890	2900				
													
	-----ExonVI-----													
Spleißmuster														
At Chr 5														
AtRpp30 1-3														
	CTGAAA	CCGAAAGCTAG	TCACCAAG	CCCCAAG	TCCAA	TCCCTCTGAAAA	TAAACAA	TGACACAAAA	TCAGG	TACGAGAT	CTAAAG	TTCCCTCAT	TTCGAAAACTTA	2898
AI995032														
	CTGAAA	CCGAAAGCTAG	TCACCAAG	CCCCAAG	TCCAA	TCCCTCTGAAAA	TAAACAA	TGACACAAAA	TCAGG	-----				2008
	CTTGAA	CCGAGCTAG	TCACCA	-GCCCCAG	TCGAA	TCCTCTGAAATTA	-CAA	TGGCACAAAA	TCAG	-----				474

Abb. 88: Alignment der AtRpp30-Spleißvarianten mit der Chromosomalen Region

Transkriptionsstart: ***; Translationsstart: AUG1; Stopcodons: AtRpp30-1: UAG1; Stopcodons: AtRpp30-2 und AtRpp30-3: UGA2; AtRpp30-0 ist die in den Expressionsvektor pRSET-A klonierte Teilsequenz von AtRpp30-3. Das Stopcodon für diese Teilsequenz wird vom Vektor geliefert. AtRpp30-1, 2 und 3 repräsentieren die drei *in vivo* existierenden Spleißvarianten sowie die drei in dieser Arbeit identifizierten Polyadenylierungsstellen. At Chr 5: die für AtRpp30p kodierende Genomregion auf Chromosom 5; Promotor: bezeichnet den bioinformatisch ermittelten, 480 Bp langen Promotorbereich (O'Connor et al., 2005); 5'/3'-UTR: untranslatierte Sequenz am 5'/3'-Ende der mRNA. A1995032, H36851: ESTs aus der NCBI-Datenbank.

Alignment der Rpp30 Proteine:

Str.	Pho	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Str.	Ddi	27									
Pho		21									
Ddi		46									
Sce		74									
Dme		76									
Dre		71									
Xtr		68									
Gga		68									
Mmu		68									
Hsa		68									
Ath (0-3)		92									
Str.	Pho	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Str.	Ddi	92									
Pho		83									
Ddi		143									
Sce		171									
Dme		172									
Dre		170									
Xtr		164									
Gga		168									
Mmu		168									
Hsa		168									
Ath (0-3)		192									

[illegible]

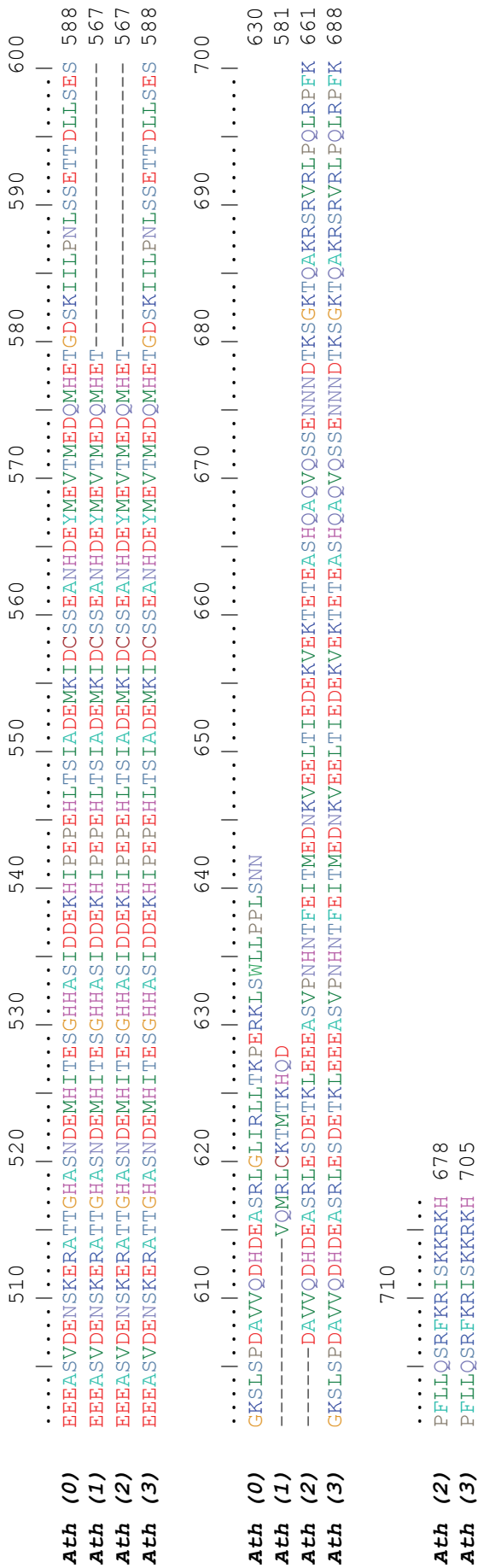


Abb. 89: Alignment von AtRpp30p-Varianten mit Rpp30p-Homologen anderer Organismen

Sequenzidentitäten über 80 % sind farblich gekennzeichnet und die Strukturelemente Helix (H) und β -Faltblatt (B) sind in den oberen Zeilen angegeben. *Str. Pho*: die Struktur von Rpp30p aus *Pho* ist durch Röntgenkristallstruktur-Analysen aufgeklärt worden; *Str. Ddi*: die Struktur von Rpp30p aus *Ddi* entstand durch Homologie-abhängige Modellierung. Organismen: *Pho*: *Pyrococcus horikoshii*; *Ddi*: *Dictyostelium discoideum*; *See*: *Saccharomyces cerevisiae*; *Dme*: *Drosophila melanogaster*; *Dre*: *Danio rerio*; *Xtr*: *Xenopus tropicalis*; *Gga*: *Gallus gallus*; *Mmu*: *Mus musculus*; *Hsa*: *Homo sapiens*. *Ath* (0-3): die ersten 488 Aminosäuren der 3 Isoformen von AtRpp30p sind identisch; *Ath* (0): AtRpp30-0, 630 AS, 69 kDa, heterolog exprimiertes Protein; *Ath* (1): AtRpp30p-1, 581 AS, 64 kDa; *Ath* (2): AtRpp30p-2, 678 AS, 75,3 kDa; *Ath* (3): AtRpp30p-3, 705 AS, 78 kDa.

Tab. 6: Analyse der Proteinsequenzen von AtRpp30p

AtRpp30-1p 678 AS	AtRpp30-1p 581 AS	AtRpp30-3p 705 AS	Sequenzmotiv
PS00005 Protein kinase C phosphorylation site :			
26 - 28:	26 - 28:	26 - 28:	TIR
48 - 50:	48 - 50:	48 - 50:	SiK
54 - 56:	54 - 56:	54 - 56:	SdK
154 - 156:	154 - 156:	154 - 156:	TdK
189 - 191:	189 - 191:	189 - 191:	TrR
320 - 322:	320 - 322:	320 - 322:	SsK
642 - 644:		588 - 590:	SgK
		669 - 671:	SgK
673 - 675:		700 - 702:	SkK
PS00007 Tyrosine kinase phosphorylation site :			
34 - 40:	34 - 40:	34 - 40:	Kam.ElG.Y
PS00008 N-myristoylation site :			
42 - 47:	42 - 47:	42 - 47:	GlahNR
88 - 93:	88 - 93:	88 - 93:	GVprTT
PS00001 N-glycosylation site :			
46 - 49:	46 - 49:	46 - 49:	NRSI
431 - 434:	431 - 434:	431 - 434:	NQTA
		576 - 579:	NLSS
638 - 641:		665 - 668:	NDTK
PS00006 Casein kinase II phosphorylation site :			
54 - 57:	54 - 57:	54 - 57:	SdkD
217 - 220:	217 - 220:	217 - 220:	SvtE
273 - 276:	273 - 276:	273 - 276:	SagD
295 - 298:	295 - 298:	295 - 298:	SsgE
328 - 331:	328 - 331:	328 - 331:	SvID
377 - 380:	377 - 380:	377 - 380:	SsdD
389 - 392:	389 - 392:	389 - 392:	SqiD
396 - 399:	396 - 399:	396 - 399:	SedD
443 - 446:	443 - 446:	443 - 446:	TksE
457 - 460:	457 - 460:	457 - 460:	StsE
467 - 470:	467 - 470:	467 - 470:	SksD
476 - 479:	476 - 479:	476 - 479:	SpvE
493 - 496:	493 - 496:	493 - 496:	SvdE
508 - 511:	508 - 511:	508 - 511:	SndE
522 - 525:	522 - 525:	522 - 525:	SidD
537 - 540:	537 - 540:	537 - 540:	SiaD
559 - 562:	559 - 562:	559 - 562:	TmeD
578 - 581:		605 - 608:	SrlE
585 - 588:		612 - 615:	TklE
602 - 605:		629 - 632:	TmeD
612 - 615:		639 - 642:	TieD
621 - 624:		648 - 651:	TetE
PS00004 cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site :			
417 - 420:	417 - 420:	417 - 420:	RKcS
670 - 673:		697 - 700:	KRiS

Die Analyse erfolgte durch ScanProsite auf www.expasy.org

Alignment der *Rpp38* mRNAs:

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
									
Spleißmuster										
At Chr 4	AAACGTAAGCGCGGAA	TGGCGTAAAGGTTTAAACCTTTTCTTTGATAAACCGAACAAAAATATGTTTTCA	TGTGCAAAAAATAAA	TTTTTGTCTCATCTGGA	TT	100				
Promotor	-----AGGTTTAAACCTTTTCTTTGATAAACCGAACAAAAATATGTTTTCA	TGTGCAAAAAATAAA	TTTTTGTCTCATCTGGA	TT	76					
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
									
Spleißmuster										
At Chr 4	TTTTGATTTGATGATTTGCAGCTGCAAGAGGGAC	TGAAGAAAAAGCTTAGTTGCAGAGAAAA	TGTGTTTTGGTTTTTGGTTTATTC	TTTTTTTGTCTCTCA	200					
Promotor	TTTTGATTTGATGATTTGCAGCTGCAAGAGGGAC	TGAAGAAAAAGCTTAGTTGCAGAGAAAA	TGTGTTTTGGTTTTTGGTTTATTC	TTTTTTTGTCTCTCA	176					
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
									
Spleißmuster										
At Chr 4	GAACTTTAGTGAATAGTTGACACAACTTTTGATGTC	TTCGATCGTTTTGATGTTTCA	TGTGAAAATATTTCTAGGAGTATG	CCCGCCTCTTTTGACAAATGAGT	300					
Promotor	GAACTTTAGTGAATAGTTGACACAACTTTTGATGTC	TTCGATCGTTTTGATGTTTCA	TGTGAAAATATTTCTAGGAGTATG	CCCGCCTCTTTTGACAAATGAGT	276					
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
									
Spleißmuster										
At Chr 4	AGTAAAAATGATCATATAATGCCA	TTTTTGTAAATATAATTAACA	TGTAAAAACAAC	TAGATGGCCCTCTCTTGTCTCATATCT	TAAAGCATGTCATTTAGAA	400				
Promotor	AGTAAAAATGATCATATAATGCCA	TTTTTGTAAATATAATTAACA	TGTAAAAACAAC	TAGATGGCCCTCTCTTGTCTCATATCT	TAAAGCATGTCATTTAGAA	376				
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
									
Spleißmuster										
At Chr 4	CCTTTTTATTTGTAACAAAAACAAAC	TTTTGTACAGATTAC	TTTTTAC	TTTTTCTTTTCTTTCTAGTAC	AAAAAAATTGAAATATGAC	CCCTTTTCA	TTGTTATGTTAACGTTTCA	TC	500	
Promotor	CCTTTTTATTTGTAACAAAAACAAAC	TTTTGTACAGATTAC	TTTTTAC	TTTTTCTTTTCTTTCTAGTAC	AAAAAAATTGAAATATGAC	CCCTTTTCA	TTGTTATGTTAACGTTTCA	TC	476	
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
									
Spleißmuster										
At Chr 4	TTTATAACCTATAAA	TTTTACATTCGTTTTTGGGCC	TTTTTGGCTAA	TTTACGAGATAGAC	CCCTTTTGTCAA	TGTGAAAAA	AAAAA	AAAAA	AAAAA	600
Promotor	TTTATAACCTATAAA	TTTTACATTCGTTTTTGGGCC	TTTTTGGCTAA	TTTACGAGATAGAC	CCCTTTTGTCAA	TGTGAAAAA	AAAAA	AAAAA	AAAAA	576

At Chr 4
Promotor
AtRpp38 CS1-4
ES146951
ES095257
BT024769
BX828561

7000
621

GTCTTTGTCGAACAGTTGGTGCCATCACCTAGAAACACCGATCACCCATAAACCCCTCAGAAAGAAAGATAGAAAGCTGATTTCGAAATC
GTCTTTGTCGAACAGTTGGTGCCATCACCTAGAAACACCGATCACCG-----ATGAGAGGCGGTACAACCCATAAACCCCTCAGAAAGAAAGATAGAAAGCTGATTTCGAAATC
-----ACCGATGAGAGGCGGTACAACCCATAAACCCCTCAGAAAGAAAGATAGAAAGCTGATTTCGAAATC
-----GACCGATGAGAGGCGGTACAACCCATAAACCCCTCAGAAAGAAAGATAGAAAGCTGATTTCGAAATC
-----ATGAGAGGCGGTAAACCCATAAACCCCTCAGAAAGAAAGATAGAAAGCTGATTTCGAAATC
-----CCGATGAGAGGCGGTAAACCCATAAACCCCTCAGAAAGAAAGATAGAAAGCTGATTTCGAAATC

[illegible]

At Chr 4
AtRpp38 CS1-4
CD531238
BT024769
BX828561

[illegible]

247

ExonV-

At Chr 4
 A TTG TAAA CCGAGGA TGC TGACCAAGCA TATCCAACTTAGCTGCTTCGAGAAA CGTTCCGGTTCTATGTAAAGGACAA CAAA CGAGCCTCTCTCAG 1400
 A TTG TAAA CCGAGGA TGC TGACCAAGCA TATCCAACTTAGCTGCTTCGAGAAA CGTTCCGGTTCTATGTAAAGGACAA CAAA CGAGCCTCTCTCAG 398
 A TTG TAAA CCGAGGA TGC TGACCAAGCA TATCCAACTTAGCTGCTTCGAGAAA CGTTCCGGTTCTATGTAAAGGACAA CAAA CGAGCCTCTCTCAG 314
 A TTG TAAA CCGAGGA TGC TGACCAAGCA TATCCAACTTAGCTGCTTCGAGAAA CGTTCCGGTTCTATGTAAAGGACAA CAAA CGAGCCTCTCTCAG 398
 A TTG TAAA CCGAGGA TGC TGACCAAGCA TATCCAACTTAGCTGCTTCGAGAAA CGTTCCGGTTCTATGTAAAGGACAA CAAA CGAGCCTCTCTCAG 401
 A TTG TAAA CCGAGGA TGC TGACCAAGCA TATCCAACTTAGCTGCTTCGAGAAA CGTTCCGGTTCTATGTAAAGGACAA CAAA CGAGCCTCTCTCAG 93

ExonV-

At Chr 4
AATTAGGTGAGTTGGTTAAGCTCAAGACGGCTCTAGCCATCGGTATCAAGGCTAGAGGAAAATGATCTCAAACTTCTTTCCGAGAGAT1500
AATTAGGTGAGTTGGTTAAGCTCAAGACGGCTCTAGCCATCGGTATCAAGGCTAGAGGAAAATGATCTCAAACTTCTTTCCGAGAGAT498
AATTAGGTGAGTTGGTTAAGCTCAAGACGGCTCTAGCCATCGGTATCAAGGCTAGAGGAAAATGATCTCAAACTTCTTTCCGAGAGAT414
AATTAGGTGAGTTGGTTAAGCTCAAGACGGCTCTAGCCATCGGTATCAAGGCTAGAGGAAAATGATCTCAAACTTCTTTCCGAGAGAT498
AATTAGGTGAGTTGGTTAAGCTCAAGACGGCTCTAGCCATCGGTATCAAGGCTAGAGGAAAATGATCTCAAACTTCTTTCCGAGAGAT501

ExonV-

[illegible]

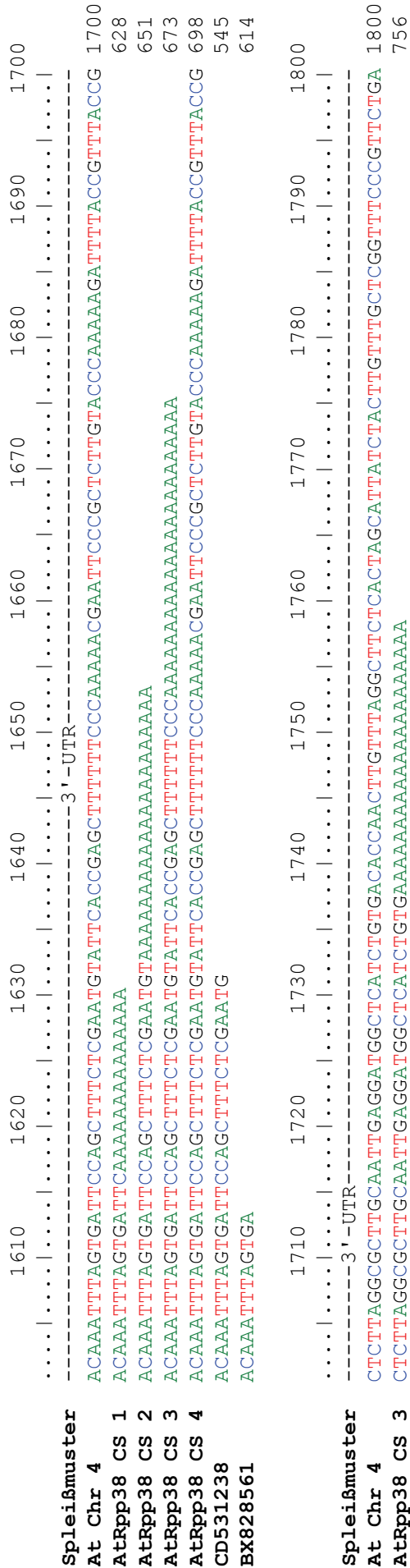


Abb. 90: Alignment der AtRpp38-Spleißvarianten mit der Chromosomalen Region
Translationsstart: AUG1; Stopcodon: UAG1; At Chr 4: die für AtRpp38p kodierende Genomregion auf Chromosom 4; Promotor: bezeichnet den bioinformatisch ermittelten, 621 Bp langen Promotorbereich (O'Connor et al., 2005). 5'/3'-UTR: untranslatierte Sequenz am 5'/3'-Ende der mRNA; AtRpp38 Cs 1, 2 und 3: durch 3'-RACE bestimmte Polyadenylierungsstellen von AtRpp38-mRNA; ES146951, ES095257, CD531238, EH97980, BT024769, CD531238, BX828561: repräsentative ESTs aus der NCBI-Datenbank.

Alignment der *Rpp29* mRNAs:

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
									
Spleißmuster										
At Chr 2	AGCCTTGAAGGATTCACTTCGTTCGGTAAAGAAACAGAAAATTGATCAAAAAGAAAAGAAAGTTGGACAAAACCGAAAACAAAGAAACAGAACCGAAACC	100								
Promotor	-----GTTTCGGTAAAGAAACAGAAAATTGATCAAAAAGAAAAGAAAGTTGGACAAAACCGAAAACAAAGAAACAGAACCGAAACC	79								
									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
									
Spleißmuster										
At Chr 2	AGATTATAATAATAAAAAAAAAAACCATGTCACGTGAGCTTTTTTAGGGTTACCGTGATCATCTATCGTCGAAAAACAAAGCGCGGACCTTCAAAAA	200								
Promotor	AGATTATAATAATAAAAAAAAAAACCATGTCACGTGAGCTTTTTTAGGGTTACCGTGATCATCTATCGTCGAAAAACAAAGCGCGGACCTTCAAAAA	179								
									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
									
Spleißmuster										
At Chr 2	TCATAAATTTTTTCTTCGCTCCCTCTCTTAGCATCGCCGTGAAATCGTTGGTCTCAGTTTCTCCGTCCAATCTTTGATTCGTCTAAGCATCTATTCA	300								
Promotor	TCATAAC-----GGCACGAG--GTTGGTCTCAGTTTCTCCGTCCAATCTTTGATTCGTCTCATCC--	186								
BE522542	-----TTTTTTTTCTTCGCTCCCTCTCTTAGCATCGCCGTGAAATCGTTGGTCTCAGTTTCTCCGTGCAATCTTTGATTCGTCTCATCC--	49								
DR235922	-----TTTTTTTTCTTCGCTCCCTCTCTTAGCATCGCCGTGAAATCGTTGGTCTCAGTTTCTCCGTGCAATCTTTGATTCGTCTCATCC--	79								
									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
									
Spleißmuster										
At Chr 2	GTTTTCATGTCCTTTTGTCTAAACCTTTTGGTTTGATTTGGGGTTTTTACCTTTGGTTAAATTAAGCTTTCTAGATTTCTTAGTTGGATTCTGTGTA	400								
									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
									
Spleißmuster										
At Chr 2	GGTTTGGTAAAACTATACAGGTTAGTTGCTATCTAGCTGCAATGGGTACAGACGGTTGTGCAATGATACAGGCAAGATGGGCAAATGGCTGCAATGGAAAC	500								
AtRpp29 CS1-3	-----ATGGGTACAGACGGTTGTGCAATGATACAGGCAAGATGGGCAAATGGCTGCAATGGAAAC	58								
BE522542	-----GTTAGTTGCTATCTAGCTGCAATGGGTACAGACGGTTGTGCAATGATACAGGCAAGATGGGCAAATGGCTGCAATGGAAAC	128								
DR235922	-----GTTAGTTGCTATCTAGCTGCAATGGGTACAGACGGTTGTGCAATGATACAGGCAAGATGGGCAAATGGCTGCAATGGAAAC	158								

[illegible]

At Chr 2

AtRpp29 CS1-3

BE522542

DR235922

At Chr 2

AtRpp29 CS1-3

44

At Chr 2

AtRpp29 CS1-3

AV555745

At Chr 2

At Chr 2

At Chr 2

AtRpp29 CS1-3

AV555745

BX838301

[illegible]

Spleißmuster

At Chr 2
AtRpp29 CS1-3
AV555745
BX838301
BE522541

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
-----IntronVI-----ExonVII-----
TTCTCTTCCCCAGGCTCAAGGCTTAACTTAGTTATTGTAAAACAACTCGATACAGTTGTACCGAAGAAAGCTCTCTGTCTC-TTCAATCA-TCCAA-CT-CGACT 1994
-----TTGTACCGAAGAAAGCTCTCTGTCTC-TTCAATCA-TCCAA-CT-CGACT 829
-----TTGTACCGAAGAAAGCTCTCTGTCTC-TTCAATCA-TCCAA-CT-CGACT 279
-----TAGTACCGAAGAAAGCTCTCTGTCTC-TTCAATCA-TCCAA-CT-CGACT 285
-----TTGTACCGAAGAAAGCTCTCTGTCTC-TTCAATCA-TCCAA-CT-CGACT 61

Spleißmuster

At Chr 2
AtRpp29 CS1-3
AV555745
BX838301
BE522541

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
-----ExonVII-----UAA1-----3'-UTR-----
GCTGG-AAAGATTACTTTTA-CAATGGGGACAAGTTTATT-TT-CAA-GAGACAAATATTGTTCAACGTTAAATGCTAAAAATGAAGCTCTAGTCGTTTTTCTTAGC 2090
GCTGG-AAAGATTACTTTTA-CAATGGGGACAAGTTTATT-TT-CAA-GAGACAAATATTGTTCAACGTTAAATGCTAAAAATGAAGCTCTAGTCGTTTTTCTTAGC 925
GCTGG-AAAGATTACTTTTA-CAATGGGGACAAGTTTATT-TT-CAA-GAGACAAATATTGTTCAACGTTAAATGCTAAAAATGAAGCTCTAGTCGTTTTTCTTAGC 375
TCAGAGAAGATTACTTTTAATCAATGGGGACAAGTTTATT-TT-CAAAGAGACAAATATTGTTCAACGTTAAATGCTAAAAATGAAGCTCTAGTCGTTTTTCTTAGC 385
GCTGG-AAAGATTACTTTTA-CAATGGGGACAAGTTTATT-TT-CAA-GAGACAAATATTGTTCAACGTTAAATGCTAAAAATGAAGCTCTAGTCGTTTTTCTTAGC 157

Spleißmuster

At Chr 2
AtRpp29 CS1-3
AV555745
BX838301
BE522541

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
-----3'-UTR-----
TAGTGGTAGAAAAGCAACCAATTGATGACCAACAGAAAGCATCCCTAACTTCACAAGAATTTTGGCTTTTAGATCTTTTCCCTTATGGACCCCAACA TTTTAA TATA TTTT 2190
TAGTGGTAGAAAAGCAACCAATTGATGACCAACAGAAAGCATCCCTAACTTCACAAGAATTTTGGCTTTTAGATCTTTTCCCTTATGGACCCCAACA TTTTAA TATA TTTT 1025
TAGTGGTAGAAAAGCAACCAATTGATGACCAACAGAAAGCATCCCTAACTTCACAAGAATTTTGGCTTTTAGATCTTTTCCCTTATGGACCCCAACA TTTTAA TATA TTTT 475
TAGTCGTAGAAAAGCAACCAATTGATGACCAACAGAAAGCATCCCTAACTTCACAAGAATCTGTCCTTATGGACCCCAACAGTTTAA TATA TTTT 485
TAGTGGTAGAAAAGCAACCAATTGATGACCAACAGAAAGCATCCCTAACTTCACAAGAATTTTGGCTTTTAGATCTTTTCCCTTATGGACCCCAACA TTTTAA TATA TTTT 257

Spleißmuster		3' - UTR	
At Chr 2		TTAACTTTGATGAACTCTGTAAAATACATACTGTTTATTTTATTAATAGAAAAAGAGTGCCTTATATCTCAGAAAT	2290
AtRpp29 CS 1		TTAACTTTGATGAACTCTGTAAAATACATACTGTTTATTTTAAAAA	1100
AtRpp29 CS 2		TTAACTTTGATGAACTCTGTAAAATACATACTGTTTATTTTATTAAGAAAAA	
AtRpp29 CS 3		TTAACTTTGATGAACTCTGTAAAATACATACTGTTTATTTTATTAAGAAAAATGAAAAA	1122
AV555745		TTAACTTTGATGAACTCTGTAAAATACATACTGTTTATTTTATTAAG	549
BX838301		TTAACTTTGATGAACTCTGTAAAATACATACTGTTTATTTTATTAAGAAAA	563
BE522541		TTAACTTTGATGAACTCTGTAAAATACATACTGTTTATTTTATTAAG	331

Abb. 91: Alignment der AtRpp29-Spleißvariante mit der Chromosomalen Region

Translationsstart: AUG1; Stopcodon: UAA1; Promotor: bezeichnet den bioinformatisch ermittelten, 186 Bp langen Promotorbereich (O'Connor et al., 2005); 5'/3'-UTR: untranslatierte Sequenz am 5'/3'-Ende der mRNA; At Chr 2: genomische Region des Chromosom 2; AtRpp29 Cs 1, 2 und 3: durch 3'-RACE bestimmte AtRpp29-mRNA; BE522542, DR235922, AV555745, BX838301, BE522541: repräsentative ESTs aus der NCBI-Datenbank.

Alignment der Rpp29 Proteine:

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Tan										
Spo	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Sce	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Ddi	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Hsa	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Mmu	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Gga	MTSLKSSRA G RAQ P RGDCCCAARCGSALR G SAGHSALLHDRAAPATPRGRL C SAP R T G EEEDAAALMRPAPVVRTRQRLRRSTAM E GVLY G GLP										
Ath	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Osa	--M G TE T VVHDQARWAMA M ERRLAVAKAQLLQQQQKNEKDK G TS D VDVSM K ESHQADSLPTPSKTSIKK V DPKDDDSVAYTKLS H PFVDEN										
	--M S TISDQKKRT L EALQQR Y AAAKAKKLQDKPRCQTRNKDSAPKPN L DASRK G AP D FIPSR T SAP F PSKK G LAISSSSASS G GETNPV S ELSFAPHD										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
Tan										
Cel	TKT E NKSNKNTTV G N L KDKD H LS F LA E KSGESLSLWKQRIENKVL H LKK E SEK T S-LVL G VS A D H YVRLPF S K F T G ISNT K GK L GLFTIKSV P Y K HA										
Dme	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Spo	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Sce	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Ddi	elsdrnkdkliaskckdvigsfgfiesirkdivdenidkpfvllsyggtseikrerkerlrle--klktklgskkkrelsffsissenci y dq y										
Hsa	Q E AN D SDVQPSGAQ R AEAFVRAFLKRSTPRMSPQAREDLQ R KAVV L EY F TR H KR-----KEKKKAK G LSARQ R RELRLFDIK P EQQ R YS L F										
Mmu	H K EAKDH D VQ E LG S Q R AEAFVRAFLKQSI P HMSQ E D C ESH L Q R KAV I LE Y F T RL K P-----RPRPKK S KG L SAQ R RD M RLFDIK P EQQ R YS L F										
Gga	REAA K ELRLQ P Q G SE E AKAFVSAFLKRMPQKK D EAIQDV L TRKAV L EH H CR R RK-----QPKRRK T KT-FTAKQ R RELRL F E I EP E QQ R Y E LF										
Ath	LLATNVKFSSAKGTIVDKVLH N LLRS G SAQ K YLQGT K SVKL D NYILLDNFVQSRSSAS G SK-KASQ K DSKRSKSRMSMKRLK S GAL H IPKDLQ K FD L F										
Zma	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Osa	NLLQ R SISDL S DM D VVHN V VY D IIQ K GG D AG K IT K GAKKL K LE K GILLDN Y VH R GPRLV D AQAK S LL I HSKRSKR H MSL K Q H KK C GS F DL P ET L RK F DL Y										

Str	Afu
Str	Mth
Str	Pho

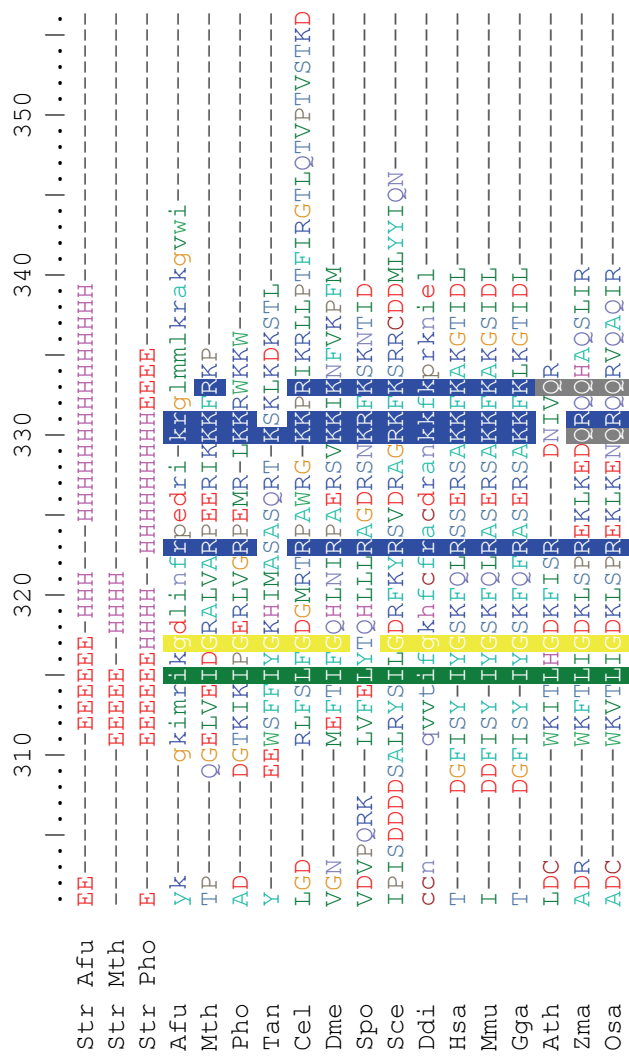


Abb. 92: Vergleich der Proteinsequenzen von AtRpp29p und Rpp29p-Homologen aus anderen Organismen

Sequenzidentitäten über 70% sind farbig markiert. Afu: *Archaeoglobus fulgidus*; Mth: *Methanothermobacter thermautotrophicus*; Pho: *Pyrococcus horikoshii*; Tan: *Theileria annulata* strain Ankara; Cel: *Caenorhabditis elegans*; Dme: *Drosophila melanogaster*; Spo: *Saccharomyces pombe*; Sce: *Saccharomyces cerevisiae*; Ddi: *Dictyostelium discoideum* AX4; Hsa: *Homo sapiens*; Mmu: *Mus musculus*; Gga: *Gallus gallus*; Ath: *Arabidopsis thaliana*; Zma: *Zea mays*; Osa: *Oryza sativum*.

Tab. 7: Messwerte für die AtPOP1p-AtMRP RNA1-Komplexbildung - Teil 1

Reaktion	Messwerte freie RNA					
	1	2	3	4	5	
1	1175811	1146600	1146600	1204515	1204515	
2	1191918	1161888	1161888	1241577	1167453	
3	1208025	1184183	1184183	1260108	1260108	
4	1166256	1122667	1122667	1204515	1204515	
Grundwert:	14771	14774	14774	13706	196735	
Reaktion	Messwerte gebundene RNA					
	1	2	3	4	5	
1	44322	36935	36935	34265	513128	
2	66483	59096	59096	61677	254408	
3	73870	66483	66483	61677	255486	
4	140353	132966	132966	130207	182490	
Grundwert:	14771	14774	14774	13706	196735	
Reaktion	gebundene RNA (fmol)					gesamt RNA (fmol)
	1	2	3	4	5	
1	49,91	38,60	38,60	34,17	423,51	2035,84
2	42,71	37,74	37,74	38,21	48,36	1027,19
3	24,39	21,88	21,88	19,18	23,29	522,87
4	1,80	1,77	1,77	1,64	-0,22	18,547
Reaktion	gebundene RNA C _{PL} (μM)					gesamt RNA C _L (μM)
	1	2	3	4	5	
1	0,0033	0,0026	0,0026	0,0023	0,0282	0,1357
2	0,0028	0,0025	0,0025	0,0025	0,0032	0,0685
3	0,0016	0,0015	0,0015	0,0013	0,0016	0,0349
4	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0000	0,0012
Reaktion	C _{PL}	R*	1/R*	R*/C _L	C _L /R*	1/C _L
1	0,0078	0,0631	15,846	0,465	2,151	7,368
2	0,0027	0,0214	46,769	0,312	3,203	14,603
3	0,0015	0,0110	91,028	0,315	3,173	28,688
4	0,0001	0,0005	2101,612	0,385	2,599	808,756

Eingesetzt wurden 0,125 μ M AtPOP1p; R^* : gewichteter Mittelwert.

Tab. 8: Messwerte für die AtPOP1p-AtMRP RNA1-Komplexbildung - Teil 2

		Messwerte freie RNA				
Reaktion		1	2	3	4	
1		76570	101270	96900	139860	
2		80104	108680	100776	143640	
3		76570	102942	94962	139860	
4		71858	103664	93100	132300	
5		51832	86450	71706	102060	
6		43586	77748	62016	86940	
Grundwert:		16492	40660	18772	55300	
		Messwerte gebundene RNA				
Reaktion		1	2	3	4	
1		18848	49894	21888	71890	
2		15314	40660	18772	60830	
3		18848	40660	21660	71890	
4		22382	52858	25992	82950	
5		29450	85386	36100	121660	
6		44764	112784	53428	149310	
Grundwert:		16492	40660	18772	55300	
		gebundene RNA (fmol)				gesamt RNA (fmol)
Reaktion		1	2	3	4	
1		92,18	258,05	96,21	327,46	3088,09
2		-31,04	0,00	0,00	77,09	2079,45
3		47,02	0,00	46,49	167,03	1575,12
4		81,12	112,73	77,07	185,11	1070,80
5		113,30	193,15	110,25	223,20	566,48
6		24,45	29,91	22,28	32,29	62,15
		gebundene RNA C _{PL} (μM)				gesamt RNA C _L (μM)
Reaktion		1	2	3	4	
1		0,0061	0,0172	0,0064	0,0218	0,206
2		-0,0021	0,0000	0,0000	0,0051	0,139
3		0,0031	0,0000	0,0031	0,0111	0,105
4		0,0054	0,0075	0,0051	0,0123	0,071
5		0,0076	0,0129	0,0073	0,0149	0,038
6		0,0016	0,0020	0,0015	0,0022	0,004
Reaktion	C _{PL}	R*	1/R*	R*/C _L	C _L /R*	1/C _L
1	0,0129	0,107	9,358	0,519	1,926	4,857
2	0,00077	0,001	970,031	0,007	134,475	7,213
3	0,00434	0,023	43,535	0,219	4,572	9,523
4	0,0076	0,042	24,054	0,582	1,717	14,008
5	0,01066	0,057	17,569	1,507	0,663	26,479
6	0,00182	0,011	90,263	2,674	0,374	241,338

Eingesetzt wurden 0,135 μ M AtPOP1p; R^* : gewichteter Mittelwert.

Tab. 9: Messwerte für die AtRpp38p-AtMRP RNA1-Komplexbildung - Teil 1

Reaktion	Messwerte freie RNA					
	1	2	3	4	5	
1	1678320	1587184	1587184	1574640	1627857	
2	1426572	1294808	1294808	1299078	1395306	
3	965034	877128	877128	866052	930204	
4	587412	584752	584752	531441	570807	
5	188811	167072	167072	157464	190269	
Grundwert:	251748	396796	383360	237573	270570	
1	935874	1361985	1038870	990171		
2	715149	1051830	808010	819553		
3	512082	836070	623322	586551		
4	379647	593340	390195	390195		
Grundwert:	143208	381300	0	0		
Reaktion	Messwerte gebundene RNA					
	1	2	3	4	5	
1	1804194	918896	939504	712719	784653	
2	1006992	1273924	1294992	1052109	1082280	
3	1384614	1608068	1701264	1459377	1515192	
4	1468530	1440966	1574304	1561194	1596363	
5	1804194	1837792	2031360	2172096	2056332	
Grundwert:	251748	396796	383360	237573	270570	
1	1131894	1162965	813816	774478		
2	1387125	1506135	1123850	1196525		
3	1486998	1849305	1657245	1629406		
4	1575288	2339665	1966287	2058555		
Grundwert:	143208	381300	0	0		
Reaktion	gebundene RNA (fmol)					gesamt RNA (fmol)
	1	2	3	4	5	
1	975,29	502,39	527,42	470,48	487,13	2029,66
2	353,43	412,33	422,15	393,47	375,51	1021,01
3	279,01	299,68	310,32	302,36	295,69	516,69
4	178,40	169,57	177,47	188,74	184,91	264,53
5	11,02	11,08	11,23	11,43	11,17	12,37
1	1045,85	742,35	894,27	893,50		2029,66
2	652,22	530,82	597,57	609,63		1021,01
3	378,60	333,14	379,96	384,47		516,69
4	213,98	207,76	225,88	227,57		264,53
Reaktion	gebundene RNA C _{PL} (μM)					gesamt RNA C _L (μM)
	1	2	3	4	5	
1	0,065	0,033	0,035	0,031	0,032	0,135
2	0,024	0,027	0,028	0,026	0,025	0,068
3	0,019	0,020	0,021	0,020	0,020	0,034
4	0,012	0,011	0,012	0,013	0,012	0,018
5	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
1	0,070	0,049	0,060	0,060		0,135
2	0,043	0,035	0,040	0,041		0,068
3	0,025	0,022	0,025	0,026		0,034
4	0,014	0,014	0,015	0,015		0,018
Reaktion	C _{PL}	R*	1/R*	R*/C _L	C _L /R*	1/C _L
1	0,048	0,342	2,928	2,524	0,396	7,390
2	0,032	0,219	4,557	3,224	0,310	14,691
3	0,022	0,155	6,451	4,501	0,222	29,031
4	0,013	0,093	10,756	5,272	0,190	56,705
5	0,001	0,006	170,766	7,104	0,141	1213,101

Eingesetzt wurden 0,127 µM AtRpp38p; R*: gewichteter Mittelwert.

Tab. 10: Messwerte für die AtRpp38p-AtMRP RNA1-Komplexbildung - Teil 2

Reaktion	Messwerte freie RNA					
	1	2	3	4		
1	142576	36676080	35013888	26122932		
2	147420	38144652	34209840	26942586		
3	134064	34660864	32599700	24705780		
4	126616	32525416	31550344	22980804		
5	123424	31494400	32356240	23135442		
Grundwert:	100776	26411064	26630856	29791514		
1	135128	34744920	34744920	29162562		
3	138320	35601440	35037520	27150200		
4	125552	32419016	29218784	25537820		
5	109592	28243880	29014216	22812020		
6	118104	30441040	27658540	22092928		
Grundwert:	100776	26411064	26630856	29791514		
Reaktion	Messwerte gebundene RNA					
	1	2	3	4		
1	178296	46325952	41829480	41918940		
2	162792	41903436	39610944	40164438		
3	174420	45174780	39072132	43347756		
4	178296	46031376	46358784	44972684		
5	120156	31283196	31510512	33535152		
Grundwert:	100776	26411064	26630856	29791514		
1	108528	28275420	29813280	36416680		
3	158916	40841412	40989270	43465176		
4	178296	46081764	47401200	41411150		
5	220932	57690384	53398170	50929586		
6	232560	60109008	57460752	56322666		
Grundwert:	100776	26411064	26630856	29791514		
Reaktion	gebundene RNA (fmol)				gesamt RNA (fmol)	
	1	2	3	4		
1	112,82	105,90	174,48	384,96	2079,45	
2	466,41	454,95	433,25	437,85	1575,12	
3	316,89	308,84	311,26	358,66	1070,80	
4	216,24	213,92	235,37	177,14	566,48	
5	164,38	165,17	150,83	151,17	314,32	
1	732,40	731,78	629,42	659,30	2079,45	
3	379,66	376,09	295,78	379,38	1070,80	
4	215,12	213,14	217,94	225,35	566,48	
5	42,66	42,11	41,19	43,78	314,32	
6	32,78	32,65	32,76	33,91	62,15	
Reaktion	gebundene RNA C _{PL} (µM)				gesamt RNA C _L (µM)	
	1	2	3	4		
1	0,008	0,007	0,012	0,026	0,139	
2	0,031	0,030	0,029	0,029	0,105	
3	0,021	0,021	0,021	0,024	0,071	
4	0,014	0,014	0,016	0,012	0,038	
5	0,011	0,011	0,010	0,010	0,021	
1	0,049	0,049	0,042	0,044	0,139	
3	0,025	0,025	0,020	0,025	0,071	
4	0,014	0,014	0,015	0,015	0,038	
5	0,003	0,003	0,003	0,003	0,021	
6	0,0021852	0,00217699	0,00218412	0,00226089	0,004	
Reaktion	C _{PL}	R*	1/R*	R*/C _L	C _L /R*	1/C _L
1	0,029	0,199	5,036	1,432	0,698	7,213
2	0,030	0,229	4,371	2,179	0,459	9,523
3	0,023	0,158	6,326	2,214	0,452	14,008
4	0,014	0,104	9,606	2,757	0,363	26,479
5	0,007	0,081	12,410	3,846	0,260	47,723
6	0,002	0,017	58,938	4,095	0,244	241,338

Eingesetzt wurden 0,13 µM AtRpp38p; R*: gewichteter Mittelwert.

Tab. 11: Messwerte für die AtRpp38p-AtMRP RNA1-Komplexbildung - Teil 3

Reaktion	Messwerte freie RNA					
	1	2	3	4	5	6
3	33660	170100	181440	28080	42210	
5	33660	151200	166320	21600	33165	
6	91800	86940	94500	47520	81405	
7	156060	37800	41580	84240	141705	
8	177480	49140	45360	99360	159795	
9	36720	38250	42075	26460	33165	
Grundwert:	47880	52650	61425	106920	46800	
1	204402	351648	354816	134368	191488	181016
2	206910	381672	385020	138788	206448	195976
4	183084	305626	308652	118456	188190	177480
6	158080	282282	285285	103428	164560	154088
7	146718	255519	274120	94588	152592	142120
9	63954	134676	137808	45968	74800	64328
Grundwert:	197109	143352	197802	68816	89760	68816
1	93536	160284	148444	103360		
3	93536	158175	155400	110741		
5	105376	179968	170240	123410		
6	79328	141525	129600	92988		
7	62752	111000	116850	79040		
9	30784	52725	48450	31280		
9	28416	61050	58608	37440		
Grundwert:	28416	61050	58608	37440		
Reaktion	Messwerte gebundene RNA					
	1	2	3	4	5	6
3	287280	274950	307125	388800	263250	
5	348840	315900	359775	456840	327600	
6	348840	345150	412425	456840	339300	
7	307800	333450	429975	437400	310050	
8	273600	269100	377325	379080	269100	
9	225720	222300	368550	396630	216450	
Grundwert:	47880	52650	61425	106920	46800	
1	525624	344624	620928	312868	298418	312868
2	400191	301546	386694	316506	309672	316506
4	346434	346434	354123	353804	374272	353804
6	298650	370326	305286	385968	406436	385968
7	400191	364353	365508	377196	397664	377196
9	328515	579150	356354	387498	366520	387498
Grundwert:	197109	143352	197802	68816	89760	68816
1	194028	194028	169290	164604		
3	206682	206682	206682	191845		
5	202464	202464	202464	188700		
6	223554	223554	223554	210715		
7	236208	236208	234136	217005		
9	269952	269952	259350	224840		
9	253080	253080	253080	215673		
Grundwert:	28416	61050	58608	37440		

Eingesetzt wurden 0,32 μ M AtRpp38p.

Tab. 12: Messwerte für die AtRpp38p-AtMRP RNA1-Komplexbildung - Teil 4

Reaktion	gebundene RNA (fmol)						gesamt RNA (fmol)
	1	2	3	4	5	6	
3	1823,11	1178,04	1196,14	1891,06	1740,11		2079,45
5	1416,68	1000,49	1011,34	1483,55	1408,74		1575,12
6	820,52	825,45	843,66	942,77	837,67		1070,80
7	353,96	499,27	509,05	451,41	368,25		566,48
8	175,96	256,16	274,85	230,25	182,87		314,32
9	51,52	50,72	54,66	56,95	51,99		62,15
1	1903,65	1124,12	1679,63	1991,58	1610,30	1773,02	3088,09
2	1279,82	757,11	850,40	1655,91	1332,68	1442,47	2583,77
4	820,85	729,47	614,32	1290,77	1099,81	1126,03	1827,29
6	418,80	477,25	293,03	807,47	704,64	720,67	1070,80
7	328,88	262,72	215,02	433,51	378,77	387,77	566,48
9	41,81	47,48	33,25	54,32	48,93	51,71	62,15
1	1973,49	1400,28	1319,04	1703,49			3088,09
3	1363,84	996,80	1014,62	1210,94			2079,45
5	981,12	693,08	721,41	867,42			1575,12
6	761,31	572,34	599,65	696,84			1070,80
7	435,08	346,74	340,08	393,34			566,48
9	55,13	49,63	50,07	53,26			62,15
9	55,17	47,16	47,76	51,36			62,15
Reaktion	gebundene RNA C_{PL} (μM)						gesamt RNA C_L (μM)
	1	2	3	4	5	6	
3	0,122	0,079	0,080	0,126	0,116		0,139
5	0,094	0,067	0,067	0,099	0,094		0,105
6	0,055	0,055	0,056	0,063	0,056		0,071
7	0,024	0,033	0,034	0,030	0,025		0,038
8	0,012	0,017	0,018	0,015	0,012		0,021
9	0,003	0,003	0,004	0,004	0,003		0,004
1	0,127	0,075	0,112	0,133	0,107	0,118	0,206
2	0,085	0,050	0,057	0,110	0,089	0,096	0,172
4	0,055	0,049	0,041	0,086	0,073	0,075	0,122
6	0,028	0,032	0,020	0,054	0,047	0,048	0,071
7	0,022	0,018	0,014	0,029	0,025	0,026	0,038
9	0,003	0,003	0,002	0,004	0,003	0,003	0,004
1	0,132	0,093	0,088	0,114			0,206
3	0,091	0,066	0,068	0,081			0,139
5	0,065	0,046	0,048	0,058			0,105
6	0,051	0,038	0,040	0,046			0,071
7	0,029	0,023	0,023	0,026			0,038
9	0,004	0,003	0,003	0,004			0,004
9	0,004	0,003	0,003	0,003			0,004
Reaktion	C_{PL}	R^*	$1/R^*$	R^*/C_L	C_L/R^*		$1/C_L$
1	0,110	0,342	2,921	1,663	0,601		4,857
2	0,081	0,266	3,766	1,542	0,649		5,805
3	0,092	0,249	4,022	1,793	0,558		7,213
4	0,063	0,194	5,144	1,596	0,627		8,209
5	0,071	0,202	4,941	1,927	0,519		9,523
6	0,046	0,137	7,277	1,925	0,519		14,008
7	0,025	0,073	13,700	1,933	0,517		26,479
8	0,015	0,038	26,570	1,796	0,557		47,723
9	0,003	0,010	101,592	2,376	0,421		241,338

Eingesetzt wurden 0,32 μM AtRpp38p; R^* : gewichteter Mittelwert.

Tab. 13: Spezifität der verwendeten Seren vor und nach der Vorbehandlung

Antikörper	aPOP1		aRpp38		aRpp29		aRpp30	
Serum-Nr	2293		3706		1043		0001	
Verdünnung	1:30000		1:20000		1:12000		1:2000	
Vorbehandlung	-	+	-	+	-	+	-	+
POP1	+	+	+	+	+	-	n.g.	n.g.
Rpp38	+	-	+	+	+	-	n.g.	n.g.
Rpp30	+	-	-	-	+	-	+	n.g.
Rpp29	+	-	+	+	+	+	n.g.	n.g.
CYP153-His	+	-	n.g.	n.g.	-	-	n.g.	n.g.

Die Vorbehandlung mit *E. coli*-Lysat nach 3.7.10.1 dient zum entfernen unspezifischer Antikörper. Das Protein CYP153His ist ein Fusionsprotein einer Alkanmonooxygenase (CYP153) und einem His₆-Tag. Es wurde freundlicherweise von Dr. O. Asperger (Institut für Biochemie, Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Krehan, Mario
Geburtstag, -ort: 03.11.1979, Leipzig

Schulbildung:

1986 - 1991 42. Oberschule Leipzig „Alexander Puschkin“
1991- 1992 Georg-Schumann-Schule
1992 - 1998 Richard-Wagner-Gymnasium (Abitur)
1998 - 1999 Zivildienst, Universitätsklinikum Leipzig

Studium:

1999 - 2004 Diplomstudium der Biochemie an der Universität Leipzig
2004 Diplomarbeit: Überexpression und Aufreinigung
des RNase P-Proteins AtRpp29 aus *Arabidopsis thaliana*
2004 - 2011 Promotionsarbeit: Funktion und Zusammensetzung der nukleären
RNase P und RNase MRP in Pflanzen

Weitere Tätigkeiten während des Studiums:

07-09 2002	Studentische Hilfskraft in der Sequenziergruppe des Max-Planck-Instituts für evolutionäre Anthropologie
10-12 2002	Studentische Hilfskraft für das Projekt „Cytochrom P450 in <i>Acinetobacter spec.</i> “ an der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
05-07 2003	Studentische Hilfskraft zur Betreuung des CIP Pool an der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
07-09 2003	Studentische Hilfskraft für das Projekt „Cytochrom P450 in <i>A. spec.</i> “ an der Fakultät für Chemie und Mineralogie
08-09 2004	Studentische Hilfskraft zur Praktikumsbetreuung „Biochemie für Biologen“ an der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

Leipzig, 31.12.2011

Mario Krehan

Verzeichnis der Publikationen

Originalpublikation:

Krehan M, Heubeck C, Menzel N, Seibel P und Schön A (2011) RNase MRP RNA and RNase P activity in plants are associated with a POP1p containing complex, *Nucleic Acids Res.*, in Revision

Publizierte Poster:

Krehan M, Gimple O, Heubeck C, Dahl J, Menzel N und Schön A

Evolution of RNase P structure and function

Road to the RNA World: Intersections of Theory and Experiment 09. - 11.06.2005

Krehan M, Gimple O, Heubeck C, Dahl J, Menzel N und Schön A

Function and architecture of eukaryotic RNase P

21st International tRNA Workshop, Bangalore 02. - 07.12.2005

Krehan M, Heubeck C, Braun S, Dahl J, Menzel N und Schön A

RNase P and MRP as tools in cellular therapy

5. Biotechnologietag der Universität Leipzig 18. - 19.05.2006

Krehan M, Braun S, Dahl J, Menzel N, Heubeck C und Schön A

Of plants and humans: Differences and similarities in RNase P/MRP

4th Meeting of the GBM study section RNA Biochemistry & Workshop microRNAs, Kassel, 12. -15.09.2006

Krehan M, Braun S, Dahl J, Menzel N, Heubeck C und Schön A

RNase P and MRP: function and architecture in plants

Sächsischer Biotechnologietag in Dresden, 28.11.2007

Krehan M, Braun S, Dahl J, Menzel N, Heubeck C und Schön A

RNase P in Plants

6th Leipzig Research Festival for Life Science, 14.12.2007

Krehan M, Braun S, Dahl J, Menzel N, Heubeck C und Schön A

RNA-Protein Interactions in the RNase P/ MRP complex from Plants

5th Meeting of the GBM study section RNA-Biochemistry, Kassel, 18. - 21.09.2008

Krehan M, Braun S, Dahl J, Menzel N, Heubeck C und Schön A

Investigation of Plant RNase P

7th Leipzig Research Festival for Life Science, 12.12.2008

Krehan M, Braun S, Dahl J, Menzel N, Heubeck C und Schön A

Interactions in the plant RNase P/ MRP

Saxon Biotechnology Symposium, 26.05.2009

Krehan M, Gimple O, Heubeck C, Dahl J, Menzel N und Schön A

RNA-Protein Interactions in the RNase P/MRP complex from Plants

23rd tRNA workshop, Aveiro, Portugal, 28.01-02.02.2010

Stipendien

FAZIT-Stiftung, Gemeinnützige Verlagsgesellschaft mbH, Hellerhoferstr. 2-4, 60327 Frankfurt am Main; 01.09.2008-28.02.2009

Stipendium der Molekularen Zelltherapie, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig, Deutscher Platz 5, 04103 Leipzig; 01.05.2009-14.09.2009

Selbständigkeitserklärung

Erklärung über die Eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Das aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Material ist als solches kenntlich gemacht.

Alle Personen, die direkt an dem Entstehen der Promotionsschrift beteiligt waren, wurden genannt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistung für Arbeit erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorgelegte Dissertationsschrift wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form zum Zwecke einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt oder veröffentlicht.

Leipzig, 31.12.2011

Mario Krehan

Danksagung

Frau PD Dr. Astrid Schön gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen, für die engagierte fachliche Betreuung der Arbeit und die Unterstützung, die sie mir stets in jeglicher Hinsicht gewährt hat.

Ein Teil der Arbeiten wurde im Radioaktivlabor des Instituts für Biochemie durchgeführt. Daher möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Mario Mörl und seiner Arbeitsgruppe dafür bedanken, ihre Räumlichkeiten nutzen zu dürfen. Durch den freundlichen und professionellen Umgang habe ich mich stets willkommen gefühlt.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Seibel, der mir die Durchführung dieser Arbeit am BBZ Leipzig ermöglichte. Seine materielle Unterstützung sowie Diskussionen und Anregungen haben einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

An dieser Stelle möchte ich mich außerdem herzlich bei Frau Dr. Möschke für die Ermöglichung und zeitaufwendige Versorgung der *Arabidopsis thaliana*-Kulturen sowie die Bereitstellung des Blattmaterials von *Nicotiana tabacum* var. Samsun bedanken.

Für die aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der „Molekulare Zelltherapie“: Euch allen vielen Dank für die Unterstützung! Auch wenn ich nicht alle namentlich erwähnen kann, möchte ich hier nennen: Dr. Alexandra Kukat, Dr. Christian Kukat, Ingo Schäfer, Birgit Löffler, Diana Behrends, Susanna Schubert, Sandra Heller, Angela Mühlberg, Stefan Achatz, Christina Paul. Herrn Dr. Olaf Gimple, Herrn Dr. Christian Heubeck, Frau Dr. Sabine Arends sowie Nicolas Menzel möchte ich dafür danken, durch Einsicht in ihre Arbeiten wertvolle Informationen für mein Projekt gewonnen zu haben. Sebastian Braun hat mit und während seiner Diplomarbeit über das RNase P-Homologe Rpp14 aus *Arabidopsis thaliana* wertvolle Arbeit und Ideen zu diesem Thema beigetragen.

Für die Finanzierung dieser Arbeit gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der FAZIT-Stiftung und Prof. Dr. P. Seibel.